

Université de Montréal

**Module microfluidique intégrant des séparations
multidimensionnelles: Applications d'analyses protéomiques
sur des extraits cellulaires**

Par

Mihaela Ghitun

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en chimie

Décembre 2006

© Mihaela Ghitun, 2006



Q1

3

U54

2007

V. 018



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Module microfluidique intégrant des séparations multidimensionnelles:
Applications d'analyses protéomiques sur des extraits cellulaires**

présenté par:
Mihaela Ghitun

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Karen Waldron
Dr. Pierre Thibault
Dr. Dominic Rochefort

présidente rapporteuse
directeur de recherche
membre du jury

Accepté

Sommaire

Dans le contexte de la recherche protéomique, ce projet porte sur l'application d'un système microfluidique flexible, pour l'analyse des mélanges biologiques complexes. Ce système est fait d'un substrat de Kapton® et intègre une pré-colonne, une colonne chromatographique et un émetteur d'électronébulisation. Le tout représente, à une échelle miniaturisée, les composants conventionnels de la technique de séparation par chromatographie liquide nano couplée à la spectrométrie de masse utilisant la nébulisation. En employant un digestat tryptique de huit protéines standard, la capacité de charge, l'influence de la direction d'élution et de la température sur les performances analytiques de la puce nano-HPLC ont d'abord été évaluées. Une variation linéaire de l'intensité des ions a été observée sur plus de deux ordres de grandeur pour une capacité de charge allant jusqu'à 100 ng, en utilisant une puce nano-HPLC munie d'une pré-colonne de 30 nL. La capacité de charge a été augmentée jusqu'à 400 ng en utilisant une pré-colonne de 160 nL. L'élution des peptides de la pré-colonne vers la colonne de séparation peut se faire dans le même sens ou en sens contraire à celui du chargement de l'échantillon sur la pré-colonne. L'élution en sens contraire au chargement a montré une diminution du temps de rétention pouvant aller jusqu'à 94 s, et une réduction de 5% de la largeur des pics à mi-hauteur par rapport à l'élution dans le même sens. Une perte de sensibilité pour les peptides hydrophiles a été néanmoins observée. Des analyses préliminaires portant sur l'influence de la température sur les performances de séparation de la puce nano-HPLC, ont montré que pour plus de 85% de groupes des peptides détectés de façon reproductible à travers la gamme de température, le temps de rétention a diminué progressivement à mesure que la température a augmenté de 20 °C à 60 °C. De plus, un changement de sélectivité a été observé pour ces températures allant jusqu'à l'inversion de l'ordre d'élution à 60 °C pour certains peptides. En suivant plus des 2200 groupes de peptides détectés parmi des replicatas ($n = 5$) d'un mélange tryptique de huit protéines standards, nous avons obtenu un écart type relatif de $\pm 0.22\%$ pour le temps de rétention (± 3 s), de ± 30 ppm sur la mesure de m/z et moins de $\pm 20\%$ de variation pour des intensités ioniques variant s'étalant sur trois ordres de grandeur. Une augmentation de la capacité chromatographique d'un facteur de 2.5 a été obtenue en utilisant une puce nano-HPLC comportant une pré-

colonne garnie de phase stationnaire de particules de 5 μm de diamètre avec greffon C_3 (colonne de séparation remplie de phase stationnaire C_{18} , 2.1 μm) par rapport à la phase conventionnelle C_{18} avec des particules de même dimension.

L'intégration d'une colonne échangeuse de cations avant la séparation en phase à polarité inversée sur la puce nano-HPLC a permis une augmentation de la capacité de charge ($> 1 \mu\text{g}$). Cette configuration a été évaluée dans le contexte des analyses protéomiques différentielles du modèle cellulaire U937 (monocyte/macrophage). Une très bonne reproductibilité a été obtenue pour tous les replicatas obtenus au cours de trois jours consécutifs d'analyse, avec une variation d'intensité inférieure à 40% pour plus de 95% des ions peptidiques détectés de façon reproductible. Une amélioration de la sélectivité pour l'identification des phosphopeptides a été obtenue en combinant une phase stationnaire d'affinité avec des ions métalliques immobilisés ou en utilisant une phase de TiO_2 avant la séparation en phase à polarité inversée sur la puce nano-HPLC. Ce système a été évalué dans le contexte des analyses différentielles du phosphoproteome pour identifier des changements de signalisation et de l'expression des protéines des cellules de monocytes humains suite à leur traitement avec de l'ester de phorbol (PMA). Le profil d'expression des extraits enrichis de phosphopeptides a révélé que 17% de la population globale montre une augmentation en abondance, suite à l'exposition au PMA.

Finalement, le système microfluidique a été évalué pour l'analyse de protéines intactes obtenues à partir d'extraits cellulaires nucléaires de NIH/3T3 traités ou non avec du trichostatin A. Une bonne reproductibilité des temps de rétention et des intensités ont été obtenus pour plus de 85 protéines différentes ayant des poids moléculaires couvrant une gamme de 7800 à 54000 Da. Parmi ces protéines, les histones nucléaires (H1A, H2B, H3 et H4) ont montré une certaine variation en abondance ou en poids moléculaire, suite à l'utilisation du trichostatin A. Le couplage de la puce nano-HPLC au MSD-Trap XCT Ultra a permis d'identifier l'acétylation des acides aminés Lys16, Lys12, Lys8 et Lys5 de l'histone H4.

Mots clef: Microfluidique / Protéomique / Chromatographie liquide / Spectrométrie de masse / 2D-LC/MS / Peptides / Protéines intactes / Histones / Phosphoproteome / Modifications post-traductionnelles.

Abstract

In the context of proteomic research, this project presents the application of a versatile microfluidic device, for the analyses of complex biological mixtures. The nano-HPLC-chip comprises a precolumn, a chromatographic column and a nanoelectrospray emitter embedded together in Kapton® substrate. The device integrates all components of a conventional nano-scale liquid chromatography electrospray mass spectrometry system into a miniaturized scale separation system. We first evaluated the loading capacity and the influence of the elution direction and of the temperature on the nano-HPLC-chip analytical performances, using a tryptic digest of 8 standard proteins. A linear response in peak intensity was maintained over more than 2 orders of magnitude for loading up to 100 ng of sample on a nano-HPLC-chip featuring a 30 nL precolumn. A 4 fold increase in loading capacity was achieved when using a 160 nL precolumn. When loading the sample on the precolumn, peptide elution to the chromatographic column can be performed either in the same or in the opposite direction to the sample loading. Backward elution showed a reduction of the retention time by up to 94 s and a 5% decrease in peak width at half-height. However, a decrease in sensitivity for the hydrophilic peptides was observed. Preliminary analyses of the influence of temperature of the device on the nano-HPLC-chip performances indicated that the retention time decreased progressively with the increase of temperature from 20 °C to 60 °C. Likewise, a change in selectivity was also observed for the same temperature range and led to a reversal of elution order for same peptides. Statistical analyses performed on more than 2200 reproducibly detected peptide ions from 5 replicate analyses of a 8 standard protein mixture digest, provided retention time RSD values of $\pm 0.22\%$ (± 3 s), ± 30 ppm on m/z precision and less than $\pm 20\%$ variation of intensity over three orders of magnitude. A two-fold improvement in chromatographic peak capacity of the nano-HPLC-chip (separation column C₁₈, 2.1 μ m) was achieved when substituting the traditional C₁₈, 5 μ m stationary phase of the precolumn with a C₃, 5 μ m particles.

The integration of a strong cationic exchange (SCX) column before reversed phase separation on the nano-HPLC-chip provided an increase in sample loading (> 1 μ g). This configuration was evaluated in the context of differential proteomic

analyses of the U937 cell model (monocyte /macrophage). Good reproducibility of nano-HPLC-chip-MS data was obtained for analyses performed over three consecutive days with an intensity variation lower than 40% for more than 95% of the peptide ions reproducibly detected across all replicates. Enhanced sample selectivity for the identification of phosphopeptides was obtained by combining immobilized metal affinity or TiO₂ media prior to peptide separation on the reversed phase on nano-HPLC-chip. This system was evaluated in the context of differential phosphoproteomic analyses to monitor changes in signaling events and protein expression of human U937 monocyte cells following phorbol ester treatment. Expression profiling of enriched phosphopeptide extracts revealed a subset of 17% of the entire population that showed an increase in abundance upon PMA treatment.

The microfluidic device was also evaluated in the context of intact protein separation and post-translational modifications identification from NIH/3T3 nuclei cell extracts treated or not with trichostatin A. These analyses enabled the reproducible detection of more than 85 different proteins of molecular masses ranging from 7800 to 54000 Da. Among these proteins different histone forms (H1A, H2B, H3 and H4), showed a variation in abundance or in molecular mass following chemical stimulation. The coupling of the nano-HPLC-chip to a MSD-Trap XCT Ultra enabled the identification of acetylated amino acids of histone from H4 including Lys16, Lys12, Lys8 and Lys5.

Keywords: Microfluidics / Proteomics / Liquid chromatography / Mass spectrometry / 2D-LC/MS / Peptides / Intact proteins / Histones / Phosphoproteome / Post-translational modifications.

Table des matières

Sommaire.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableau.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xviii
Remerciements.....	xxi
1. Introduction générale.....	1
1.1 But du projet.....	2
1.2 Systèmes microfluidiques couplés à la spectrométrie de masse.....	3
1.3 Spectrométrie de masse.....	7
1.3.1 Ionisation par nébulisation électrostatique.....	7
1.3.2 Analyseur de masse à temps d'envol.....	9
1.3.3 Analyseur de masse trappe ionique.....	11
1.3.4 Formation des ions fragments de basse énergie et identification des protéines par corrélation des spectres MS en tandem avec les banques de données.. ..	14
1.4 Méthodes instrumentales.....	17
2. L'évaluation de la capacité de charge du système microfluidique puce nano-HPLC et l'influence de la direction d'élution et de la température sur le processus de séparation.....	22
2.1 Introduction.....	23
2.2 Matériels et méthodes.....	27
2.2.1 Matériels.....	27
2.2.2 Préparation des échantillons.....	27
2.2.3 Analyses puce nano-HPLC-MS.....	28
2.2.4 Détection des peptides et analyse du regroupement.....	33
2.3 Résultats et discussion.....	33
2.3.1 L'évaluation de la capacité de charge.....	33

2.3.2 L'influence de la direction d'élution sur la séparation chromatographique.....	40
2.3.3 L'influence de la température sur la séparation chromatographique...	45
2.4 Conclusion.....	51
3. Integrated microfluidic devices with enhanced separation performance: Application to phosphoproteome analyses of differentiated cell model systems ...	53
3.1 Introduction.....	55
3.2 Materials and methods.....	56
3.2.1 Materials.....	56
3.2.2 Sample preparation.....	56
3.2.3 Nano LC-chip-MS analyses.....	57
3.2.4 Database searching with mass spectrometry data.....	58
3.2.5. Peptide detection and clustering.....	58
3.3 Results and Discussion.....	58
3.3.1 Evaluation of chromatographic performance of the LC-chip-MS system.....	59
3.3.2 Enhancement of chromatographic performance using different reversed phase media.....	63
3.3.3 Application to the identification of trace-level phosphoproteins.....	66
3.3.4 Phosphoproteome analyses of U937 cells following the exposure to phorbol ester.....	69
3.4 Conclusion.....	72
4. Modular microfluidics devices combining multi-dimensional separations; Applications to targeted proteomics analyses of complex cellular extracts.....	74
4.1 Introduction.....	78
4.2 Materials and methods.....	78
4.2.1 Materials.....	78
4.2.2. Cell cultures.....	78
4.2.3 Protein extraction and digestion.....	79
4.2.4 Phosphopeptides isolation.....	79
4.2.5 Nano chip LC and 2DLC analyses.....	80

4.2.6. Peptide detection and clustering.....	80
4.2.7 Database searching with mass spectrometry data.....	81
4.3 Results and discussion.....	81
4.3.1 Reproducibility of chromatography and mass spectrometry performances of the LC-Chip-MS system.....	82
4.3.2 Comparative peptide detection and identification using two-dimensional chromatography (SCX/C ₁₈) on a LC-Chip-MS system.....	85
4.3.3 Selective enrichment of phosphopeptides using TiO ₂ and differential phosphoproteome analyses of U937 monocyte cells following the administration of phorbol ester.....	94
4.4 Conclusion.....	100
5. L'application du système microfluidique intégré pour la séparation des protéines provenant d'extraits cellulaires complexes.....	103
5.1 Introduction.....	104
5.2 Matériels et méthodes.....	107
5.2.1 Matériels.....	107
5.2.2 Préparation des échantillons.....	107
5.2.3 Analyse par immunobuvardage.....	108
5.2.4 Analyses puce nano-HPLC-MS.....	109
5.2.5 Recherche des résultats de MS en tandem et corrélation avec une base de données.....	112
5.3 Résultats et discussion.....	113
5.3.1 L'évaluation de la reproductibilité chromatographique pour les analyses de séparation des protéines intactes.....	113
5.3.2 La détection des modifications post-traductionnelles des histones...	114
5.3.3 L'identification des PTM et de leurs sites de modifications pour l'histone H4.....	120
5.4 Conclusion.....	123
6. Conclusion générale.....	124
7. Références.....	130

Liste des tableaux

Tableau 2.1 Conditions chromatographiques expérimentales pour l'évaluation de la capacité de charge et de l'influence de la direction d'élution et de la température.....	30
Tableau 2.2 Conditions d'opération du spectromètre de masse MSD-TOF pour l'évaluation de la capacité de charge et de l'influence de la direction d'élution et de la température.....	32
Tableau 3.1 Figures of merit for different stationary phase configurations.....	65
Tableau 4.1 Partial list of identified proteins showing differential expression upon PMA treatment.....	91
Tableau 4.2 Summary of phosphoproteome analysis obtained on U937 differentiated cells.....	100
Tableau 5.1 Conditions chromatographiques expérimentales pour la séparation des protéines intactes et pour l'identification des sites de PTM.....	110
Tableau 5.2 Conditions d'opération du spectromètre de masse MSD - TOF pour la séparation des protéines intactes.....	111
Tableau 5.3 Conditions d'opération du spectromètre de masse MSD-Trap XCT Ultra pour l'identification des sites de PTM.....	112

Liste des figures

Figure 1.1	La formation des ions positives desolvatés par ESI.....	8
Figure 1.2	Schéma d'analyseur TOF.....	9
Figure 1.3	Schéma d'un analyseur de masse oa-TOF.....	10
Figure 1.4	Schéma de la trappe ionique.....	11
Figure 1.5	Diagramme de stabilité des ions pour une trappe ionique.....	13
Figure 1.6	Fragmentation des peptides par CID, reproduit de [59].....	14
Figure 1.7	Page montrant les paramètres de recherche MS-MS du moteur Mascot.....	16
Figure 1.8	Système nano Series 1100 LC/MSD TOF (Agilent Technologies) avec le prototype Rev 3 de l'interface du système microfluidique (a); interface de la puce nano-HPLC (b); puce nano-HPLC (c); bout de la puce avec l'émetteur d'électronébulisation (d).....	17
Figure 1.9	Système nano Series 1100 LC/MSD Ion Trap (Agilent Technologies) avec l'interface "chip-cube" du système microfluidique (a); interface chip-cube de la puce nano-HPLC (b); puce nano-HPLC encapsulée, (photo reçue d'Agilent Technologies) (c).....	18
Figure 1.10	Puce nano-HPLC encapsulée.....	19
Figure 1.11	Schéma tridimensionnel de la puce nano-HPLC. (a) position du rotor à l'étape de chargement d'échantillon sur la pré-colonne ; (b) position du rotor à l'étape d'élution des peptides ; (c) vue latérale du système microfluidique encadré du rotor et du stator, reproduit de [63]	20
Figure 2.1	Variation de la réponse du spectromètre de masse pour différents ions peptidiques en fonction de la quantité totale de digestat trypsique injectée (1 – 1000 ng). Résultats obtenus sur une puce nano-HPLC garnie d'une phase stationnaire Jupiter C ₁₈ , 300 Å ayant des particules d'une taille de 4 µm dans la pré-colonne et d'une taille de 3 µm dans la colonne chromatographique. Les valeurs de coefficients de corrélation (R ²) sont calculées pour le domaine linéaire de 1 à 100 ng.....	34
Figure 2.2	L'effet de la saturation de la pré-colonne (volume 30 nL) du système microfluidique sur l'ion peptidique triplement chargé de $m/z = 501.59$, a) Profils chromatographiques superposés pour des quantités de digestat	

trypsique de huit protéines injectée (1 – 1000 ng). b) Variation du temps de rétention selon la quantité injectée. c) Variation de la largeur du pic à mi-hauteur selon la quantité injectée. d) Variation de l'asymétrie du pic, calculé à 10% d'hauteur, pour différentes quantités injectées.....35

Figure 2.3 Variation de la réponse du spectromètre de masse pour différents ions peptidiques en fonction de la quantité injectée de digestat trypsique de huit protéines (5 – 5000 ng). Résultats obtenus sur une puce nano-HPLC ayant la pré-colonne et la colonne de séparation garnies de phase stationnaire Zorbax C₁₈ avec des particules et des pores d'une taille de 5 µm et 300 Å respectivement, et un volume de la pré-colonne de 160 nL. Les valeurs de coefficients de corrélation (R^2) sont calculées pour le domaine linéaire de 5 à 400 ng.....37

Figure 2.4 L'effet de la saturation du système microfluidique ayant une pré-colonne d'un volume de 160 nL. Profils chromatographiques superposés des ions doublement chargés de $m/z = 526.71$ (a) et $m/z = 666.85$ (b) à travers la gamme de quantités injectées de digestat trypsique des huit protéines (5 – 5000 ng).38

Figure 2.5 Variation du temps de rétention des différents ions peptidiques à travers la gamme de quantités injectées de digestat trypsique de huit protéines (5 – 5000 ng), (a); Distribution du % de changement (e.g., diminution) du temps de rétention pour l'injection de 400 ng et de 5000 ng respectivement en fonction du temps de rétention pour 5 ng injectées (b). Analyses effectuées sur une puce nano-HPLC garnie de phase stationnaire Zorbax C₁₈, 5µm et ayant une pré-colonne de 160 nL et une colonne chromatographique de 150 mm de longueur.....39

Figure 2.6 L'effet de la direction d'élution de la pré-colonne sur l'intensité des peptides. Résultats obtenus pour 1520 groupes de peptides détectés parmi toutes les injections (3 replicatas en FFM et 3 replicatas en BFM). Les analyses ont été effectuées sur une puce nano-HPLC garnie de phase stationnaire Zorbax C₁₈, 300Å, 5 µm et ayant une pré-colonne de 40 nL et une colonne chromatographique de 43 mm de longueur. Les lignes à 1.5 et à 0.67 (1/1.5)

marquent les limites pour lesquelles les peptides sont au moins 1.5 fois plus intense en FFM ou en BFM respectivement.....41

Figure 2.7 Profil de la variation du rapport entre la moyenne des intensités d'un peptide dans les trois replicatas effectués en FFM et la moyenne des intensités du même peptide dans les trois replicatas effectués en BFM. Les lignes à 1.5 et à 0.67 (1/1.5) marquent les limites pour lesquelles les peptides sont au moins 1.5 fois plus intense en FFM ou en BFM respectivement. Conditions identiques à celles de la figure 2.6.....42

Figure 2.8 L'effet de la direction d'élution de la pré-colonne sur le temps de rétention des peptides. Conditions identiques aux celles de la figure 2.6.....43

Figure 2.9 Comparaison entre la variation de l'écart type du temps de rétention pour les deux modes d'élution. Conditions identiques à celles de la figure 2.6.....44

Figure 2.10 Effet de la direction d'élution de la pré-colonne sur la largeur des pics. Données obtenues pour 581 groupes d'ions peptidiques ayant une intensité plus grande que 10000 et détectés de façon reproductible dans les trois replicatas en FFM et les trois replicatas en BFM. Les analyses ont été effectuées sur une puce nano-HPLC garnie de phase stationnaire Zorbax C₁₈, 300Å, 5 µm et ayant une pré-colonne de 40 nL et une colonne chromatographique de 43 mm longueur.....45

Figure 2.11 L'influence de la température sur l'intensité. a) Variation des rapports d'intensité ($I_{T^{\circ}C}$) pour les trois températures plus élevées (40 °C, 50 °C et 60 °C) par rapport à l'intensité correspondante à 20°C ($I_{20^{\circ}C}$), pour 847 ions détectés de façon reproductible à travers la gamme de températures; b) Distribution des ions peptidiques en fonction de leur intensité pour chaque température, dans des conditions identiques aux celles du point a); c) Variation de l'intensité d'un ion hydrophile doublement chargé, $m/z = 745.86$, en fonction de la température à travers la gamme de quantités injectées; d) Variation de l'intensité d'un ion hydrophobe doublement chargé, $m/z = 666.85$, en fonction de la température à travers la gamme de quantités injectées.47

Figure 2.12 L'influence de la température sur le temps de rétention. a) Distribution de la différence entre le temps de rétention à 20 °C et le temps de rétention à une température plus élevée (40 °C, 50 °C et 60 °C). Résultats obtenus pour 847 des ions détectés de façon reproductible à travers la gamme de températures, pour 100 ng injectés sur la puce nano-HPLC; b) Variation de la différence entre le temps de rétention à 20 °C et le temps de rétention à une température plus élevée (40 °C, 50 °C et 60 °C) par rapport à la quantité injectée.....48

Figure 2.13 L'effet de la température sur la sélectivité pour une région de la carte peptidique; injection de 50 ng sur une puce nano-HPLC garnie de phase stationnaire Jupiter C₁₈, 300Å, avec des particules de 4 µm dans la pré-colonne (30 nL) et de 3 µm dans la colonne chromatographique de 43 mm longueur. a) 20 °C; b) 40 °C; c) 50 °C; d) 60 °C.....50

Figure 3.1 Schematic representation of the microfluidic chip interface integrating a 30 nL volume pre-column, a 4.5 cm length analytical column with a 75 x 50 µm cross section channel and a 10 µm i.d. nanoelectrospray emitter.....59

Figure 3.2 Separation of an 8-protein tryptic digest (100 fmoles each) using nanoLC-chip-MS (TOF). a) Contour profile of m/z vs intensity vs retention time. Peptide ions are displayed on a logarithmic gray scale of increasing intensity ranging from black to white. Inset shows a narrow region of the contour profile for m/z 740-775 and 32-34 min with singly-, doubly, and triply-charged peptide ions indicated by circle, cross and triangle, respectively. b) Scatter plot of intensity measurements for 5 replicates and 742 peptide ion clusters. Conditions: Trap channel: Zorbax C₁₈-5 µm; separation channel: Zorbax C₁₈-3.5 µm.....60

Figure 3.3 Distribution of peak width and retention time measurements on replicated nanoLC-chip-MS analyses of an 8-protein tryptic digest (100 fmoles each). a) Distribution of peak widths for measurements taken at 10 and 50% height. b) Distribution of RSD values on retention time measurements. Conditions as for Figure 3.2.....62

Figure 3.4 Evaluation of different Zorbax stationary phases by nanoLC-chip-MS (TOF). a) Extracted ion chromatogram for 5 selected ions. b) Comparison of

intensity distribution for all three chromatographic phase combinations. c) Comparison of peak widths for 281 peptide clusters. Injection of 5 μL of BSA digest (120 fmols) was used in all analyses.....64

Figure 3.5 Identification of α -casein phosphopeptides spiked at different levels in a tryptic digest of mouse macrophage J774 protein extract. Clustergram of peptide cluster ions across different spike levels without (a) and with (b) IMAC enrichment. Ions of increasing abundance are transitioning from black to white on the logarithmic gray scale display. Clusters identified by dash arrows correspond to phosphopeptides ions showing a linear increase across spike levels. The solid arrow represents the doubly-charged m/z 733.78 corresponding to TVDMEpSTEVFTK from α S2 casein.....67

Figure 3.6 Targeted identification of phosphopeptide from α -casein spiked at different levels in a tryptic digest of mouse macrophage J774 protein extract. Reconstructed ion chromatograms of m/z 733.78 from nanoLC-MS analyses without (a) and with (b) IMAC enrichment. Ion intensities are normalized to that of IMAC 12.0 fmoles spike. c) MS-MS spectrum of m/z 733.78 confirming the identification and site of phosphorylation of tryptic peptide TVDMEpSTEVFTK from α S2 casein.....68

Figure 3.7 Phosphoproteome analysis of U937 cells following PMA challenge (200 ng of protein digest used for each injection). a) Clustergram of intensity distribution for 660 randomly selected peptide clusters from a total of 2624 detected peptide ions across nanoLC-chip-MS (TOF) analyses of control and PMA exposed samples. b) Expression plot showing the number of up-regulated (9 %), down-regulated (33 %) and unaffected (58 %) phosphopeptides from a total of 2624 peptide clusters.....70

Figure 3.8 Identification of differentially expressed phosphoproteins from U937 cells following PMA administration. Reconstructed ion chromatograms of (a) m/z 754.3²⁺ and (c) 854.3²⁺ showing differential abundance in control and PMA exposed cells. MS-MS spectra of (b) m/z 754.3²⁺ and (d) 854.3²⁺ confirming the protein identification and the site of phosphorylation.71

Figure 4.1 Schematic representation of the microfluidic chip cube interface comprising automated chip loading and sealing mechanisms. a) Detail of the valve assembly below a polymer chip in its carrier (a metal frame). Alignment pins enable proper insertion and chip localization. The arrow indicates the direction of chip insertion. b) Exploded view presenting the chip positioned between the rotor and stator assembly. c) Cut-out view of the chip device and fluidic connection on the switching valve.....82

Figure 4.2 Nano LC-chip-MS of replicate injections (n=5) of an eight protein digest 250 fmoles each). a) Overlay of 5 total ion chromatograms for the corresponding analyses. b) Scatter plot of intensity measurements for 5 replicates and 2230 peptide ion clusters. c) Distribution of RSD values on retention time measurements. d) Variation of mass spectrometry response for different tryptic peptides according to sample amount loaded. Conditions: Enrichment/trap volume of 40 nL; LC separation channel of 43 x 0.075 x 0.050 mm both packed with Zorbax C₁₈ separation media; a 5 µL inj of 80 ng tryptic digest of 8 proteins was performed except for d) where variable amounts (1-1000 ng) of digest were injected.....84

Figure 4.3 Comparison of peptide clusters detected using one- and two-dimensional LC separation using a nano LC-chip-MS system. a) Distribution of peptide ions according to charge and salt fractions. b) Scatter plot of intensity measurements for 3 replicates performed on the combined SCX/C18 nano LC-chip-MS system representing the intensity distribution of 7389 reproducibly detected peptide ion clusters. Conditions: Same as for Figure X2 except that a strong cation exchange column (SCX) (0.5 mm i.d. x 8 cm) was connected directly to the switching valve and was on-line with the chip C₁₈ precolumn during sample loading, and toggled off-line during reversed-phase peptide separation on the analytical column. Peptides were sequentially eluted from the SCX column onto the C₁₈ precolumn with 8 salt fractions of ammonium acetate (0, 50, 75, 100, 150, 300, 1000, 2000 mM, pH 3.5). Injection of 100 ng and 1.5 µg of protein digest from control U937 cells were injected on the one- and two-dimensional LC systems, respectively.....87

Figure 4.4 Distribution of peptide cluster intensities for control and PMA-treated U937 cells (n=3). a) Scatter plot of ion intensity for peptide clusters reproducibly detected in at least 2 replicates. The dotted line shows the 3-fold change in abundance. b) Expression plot showing the number of down-regulated (30.0 %), up-regulated (24.6 %) and unaffected (45.6 %) peptide clusters from a total of 9756 peptide clusters. Conditions: As for Figure 3 for SCX/C₁₈ separation. Replicate injections of 1.5 µg of protein digest from control and PMA-treated U937 cells were injected on two-dimensional nano LC-chip-MS systems.....89

Figure 4.5 Identification of proteins showing differential expression upon PMA treatment. Reconstructed ion chromatograms of (a) m/z 568.9³⁺ and (c) 800.99³⁺ showing differential abundance in control and PMA exposed cells. Dotted lines correspond to control digests and solid lines to PMA-treated samples. MS-MS spectra of precursor ions m/z 568.9³⁺ and 800.99³⁺ circled on the scatter plot of Figure 4.4a. MS-MS spectra of (b) m/z 568.9³⁺ and (d) 800.99³⁺ confirming identification of vimentin and HSP90-α, respectively. The Ser₂₆₂ phosphorylation site of HSP90-α is shown in (d). Conditions as for Figure 4.4.....92

Figure 4.6 Differential phosphoproteome analysis of U937 cells following PMA challenge and TiO₂ isolation. a) Scatter plot ion intensity for peptide clusters reproducibly detected in at least 2 replicates (n=1791 peptide clusters). The dotted lines represent the delimitation of ion abundance showing ± 3-fold change in standard deviation. b) Clustergram of intensity distribution for 1791 peptide clusters in control and PMA exposed samples. Conditions: As for Figure 4.2. An aliquot (50 %) of TiO₂-enriched phosphopeptides from U937 protein digests (250 µg) corresponding to approximately 150 ng injection was injected on the nano LC-chip-MS system.....96

Figure 4.7 Identification of differentially expressed phosphoproteins from U937 cells following PMA administration. Reconstructed ion chromatograms of (a) m/z 851.8²⁺ and (c) 734.8²⁺ circled on Figure 4.6a and showing increased abundance upon PMA treatment. MS-MS spectra of (b) m/z 851.8²⁺ and (d)

m/z 734.8²⁺ confirming the protein identification and the site of phosphorylation. Conditions as for Figure 4.6.....98

Figure 5.1 Structure de la chromatine. (a) Chaîne de la chromatine dans le noyau. (b) Structure hélicoïdale de la chromatine repliée. (c) Présence de PTM sur les domaines N-terminal et C-terminal des histones impliquées lors de différentes fonctions cellulaires; AC - acétylation des lysines (K), P – phosphorylation, S - sérine, T – thréonine, reproduit de [183, 185].....106

Figure 5.2 Reproductibilité de l'analyse de séparation des protéines intactes d'un extrait nucléaire NIH/3T3 (200 ng) sur une puce nano-HPLC. a) Diagramme de dispersion des intensités de trois ions multiplement chargés les plus abondants mesurées pour 25 protéines détectées de façon reproductible à travers des triplicatas. b). Variation du temps de rétention (conditions identiques à celles du point a).....114

Figure 5.3 Identification de l'expression différentielle des formes acétylées et/ou méthylées de l'histone H4 des extraits cellulaires nucléaires NIH/3T3 (200 ng) après exposition au TSA. Profils contour des extraits de protéines intactes avant (a) et après (b) le traitement avec du TSA. Les agrandissements montrent les différentes formes de l'ion multiplement chargé $[M + 16H]^{16+}$ de l'histone H4. Profils de déconvolution de l'histone H4 dans l'échantillon contrôle (c) et dans celui exposé au TSA (d), normalisés en termes d'intensité.....116

Figure 5.4 Détection des formes acétylées et méthylées des histones H2AX et H2B1. Profils moléculaires des échantillons contrôle (a) et (d) et exposés au TSA (b) et (e). Identification des sites d'acétylation des histones H2AX (c) et H2B1 (f) par immunobuvardage de type Western; le puit de gauche représente le contrôle et celui à droite correspond à l'échantillon exposé au TSA (20 µg d'extrait cellulaire nucléaire ont été chargés sur le gel pour chaque puits).....118

Figure 5.5 Détection des formes acétylées et méthylées des histones H4 et H3.1. Profils des masses moléculaires dans l'échantillon contrôle (a) et (d) et dans celui exposé au TSA (b) et (e). Evaluation du degré d'acétylation des histones H4

et H3.1 de l'extrait cellulaire nucléaire NIH/3T3 contrôle (puits gauche) et exposé au TSA (puits droite) par immunobuvardage de type Western avec anti-Acetyl His (c) et (f) respectivement.....119

Figure 5.6 Identification des résidus de l'histone H4 avec des PTM différenciellement exprimés après le traitement avec du TSA. Chromatogrammes reconstruits normalisés des ions (a) m/z 734.3²⁺ et (b) m/z 720.4²⁺ montrant des abondances différentes pour la fraction de l'histone H4 de l'extrait nucléaire NIH/3T3 contrôle et celui exposé au TSA. Spectres MS-MS des ions m/z 734.3²⁺ (c) et m/z 720.4²⁺ (d) confirmant l'identification de la protéine et des sites d'acétylation.....122

Liste des abréviations

ACN	acetonitrile (acétonitrile)
ADN	deoxyribonucleic acid (acide désoxyribonucléique)
ADNr	ribosomal deoxyribonucleic acid (acide désoxyribonucléique ribosomique)
BCA	bicinchoninic acid (acide bicinchoninique)
BFM	Backward Flush Mode (mode d'élution en sens inverse)
BSA	bovine serum albumin (albumine sérique de bovine)
C ₁₈	octadecylsilane stationary phase (phase stationnaire d'octadécylsilane)
CDK	cyclin-dependent kinase (kinase cycline dépendante)
CE	capillary electrophoresis (électrophorèse capillaire)
CID	collision induced dissociation (décomposition induite par collision)
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid (acide 2,5-di-hydroxybenzoïque)
DMSO	dimethyl sulfoxide (diméthylsulfoxyde)
2DLC	two dimensional liquid chromatography (chromatographie liquide bi-dimensionnelle)
ECD	electron capture dissociation (dissociation par capture électronique)
ECL	enzymatic chemiluminescence (chemiluminescence enzymatique)
EOF	electroosmotic flow (flux électroosmotique)
ESI	electrospray ionization (ionisation par nébulisation électrostatique)
FA	formic acid (acide formique)
FBS	fetal bovine serum (sérum de foetus bovin)
FFM	Forward Flush Mode (mode d'élution en sens direct)
HN1	neurological expressed protein 1B
HPLC	high performance liquid chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
HSP	heat shock protein (protéine de choc thermique)
IFV	injection flush volume (volume du bolus d'injection)
IMAC	immobilized metal affinity chromatography (chromatographie d'affinité avec des ions métalliques immobilisés)

LC	liquid chromatography (chromatographie liquide)
LC-MS	liquid chromatography coupled to mass spectrometry (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse)
LPS	lipopolysaccharides (lipopolysaccharides)
Lys-C	lysobacter enzymogenes endoproteinase (endoprotease Lys-C)
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization (ionisation par désorption laser avec matrice)
MARKS	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MAPK	mitogen-activated protein kinase (protéine kinase activée par des agents mitogènes)
MEKC	micellar electrokinetic chromatography (électrophorèse capillaire en milieu micellaire)
$[M+H]^+$	protonated molecule (molécule protonée)
MS	mass spectrometry (spectrométrie de masse)
MSD	mass sensitive detector (détecteur sensible à la masse)
MS-MS (MS^n)	tandem mass spectrometry (spectrométrie de masse en tandem)
m/z	mass to charge ratio (rapport masse sur charge)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centre national pour information en biotechnologie)
oa-TOF	orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer (analyseur de masse à temps d'envol à accélération orthogonale)
PKC	protein kinase C (protéine kinase C)
PMA	Phorbol ester (ester de phorbol)
pS	phosphoserine (phosphosérine)
pT	phosphothreonine (phosphothréonine)
pY	phosphotyrosine (phosphotyrosine)
PTM	post-translational modifications (modifications post- traductionnelles)
RF	radiofrequency (radiofréquence)
RP	reversed phase (phase à polarité inversée)
RSD	relative standard deviation (écart type relatif)

SCX	strong cation exchange (échange par cations forts)
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodécyl sulfate de sodium)
Ser	serine (sérine)
S:N	signal to noise ratio (rapport signal sur bruit)
Stdev	standard deviation (écart type)
TBST	Tris buffered saline-Tween (tampon salin avec détergent Tween)
TCP-1	T-complex protein-1
TFA	trifluoroacetic acid (acide trifluoroacétique)
Thr	threonine (thréonine)
TOF	time-of-flight mass spectrometer (analyseur de masse à temps d'envol)
TSA	trichostatin A (trichostatine A)
Tyr	tyrosine (tyrosine)
UBF	upstream binding factor
UV	ultraviolet (ultraviolet)

Remerciements

Premièrement, je tiens remercier mon directeur de recherche le Dr. Pierre Thibault pour m'avoir accueilli dans son group. L'encouragement et la confiance qu'il m'a accordée, ses conseils constructifs et l'intérêt qu'il a manifesté à la progression de mon projet m'ont permis de mener à terme ce dernier.

Je souhaite également remercier le Dr. Eric Bonneil pour le partage de ses connaissances sur la spectrométrie de masse, Christelle Pomiès pour la culture cellulaire et pour l'aide dans la préparation des échantillons et Gagandeep Jaitly pour l'assistance dans les logiciels de détection et de regroupement des peptides. J'aimerais également remercier mes collègues de laboratoire pour avoir créé un environnement stimulant aux échanges de connaissances.

De plus, je désire remercier le personnel de la compagnie Agilent Technologies Georges Gauthier, Hongfeng Yin, Kevin Killeen, Debbie Ritchey pour leur assistance et leur soutien concernant l'instrumentation nécessaire à l'avancement de ce projet. J'aimerais aussi remercier Linda Côté et Sébastien Marchand pour leur soutien technique.

Mes remerciements s'adressent également à mon mari, Tiberiu Pirlog, pour le soutien constant qu'il m'a apporté et sa compréhension qu'il a démontré au cours des dernières années. Finalement, je tiens remercier mes parents et mes amis pour leur encouragement et leur soutien.

1. Introduction générale

1.1 But du projet

Les modules microfluidiques basés sur la chromatographie liquide offrent des avantages considérables pour la recherche en protéomique. Ceux-ci incluent la capacité d'analyser des échantillons protéiques complexes avec sensibilité, efficacité et reproductibilité, tout en minimisant la quantité d'échantillon requis. Une amélioration de la sélectivité et de la capacité chromatographique de ces systèmes microfluidiques peut être obtenue en utilisant des milieux d'adsorption particulièrement conçus pour des applications spécifiques telles que l'analyse du phosphoprotéome ou la capture d'antigènes cibles par affinité.

Dans ce contexte, le but de ce projet comprend plusieurs volets. Dans un premier temps, nous évaluerons la reproductibilité, la capacité de charge, la sensibilité, la direction d'élution et l'influence de la température sur les performances chromatographiques du système microfluidique intégré. L'évaluation est faite à l'aide des logiciels bioinformatiques qui permettent une cartographie complète des différentes analyses microfluidiques LC-MS.

On se propose ensuite d'utiliser des séparations multidimensionnelles (chromatographie d'affinité sur métal immobilisé ou par échange d'ions couplée à une séparation en phase à polarité inversée sur le système microfluidique) pour des analyses protéomiques différentielles. L'application de ce système microfluidique sera démontrée pour les analyses du phosphoprotéome du modèle cellulaire U937 et pour l'identification des phosphoprotéines de faible abondance dans un extrait cellulaire de macrophage J774.

La dernière partie de ce projet porte sur l'évaluation du système microfluidique pour la séparation des protéines nucléaires et l'identification de leurs modifications post-traductionnelles à partir d'un extrait cellulaire de NIH/3T3.

1.2 Systèmes microfluidiques couplés à la spectrométrie de masse

L'analyse des échantillons biologiques complexes dans lesquels les molécules d'intérêt se trouvent à faible concentration ou dans des volumes très petits, présente des défis de taille pour les techniques de séparation. La miniaturisation des séparations chromatographiques ouvre également de nouvelles frontières dans l'analyse protéomique pour l'identification des protéines de faible abondance dans les extraits cellulaires complexes, grâce à la rapidité d'analyse, à la sensibilité accrue et à la quantité réduite d'échantillon et de réactif requis.

Les premiers systèmes microfluidiques ont été rapportés au début des années '90 [1-2] et étaient basés sur la séparation par électrophorèse capillaire (CE) suivie d'une détection par fluorescence induite par laser. En employant ces techniques sur une puce de verre (1 x 2 cm), Harrison et al. [3] ont réussi séparer en 15 s un mélange d'acides aminés avec une efficacité de 75000 plateaux théoriques/m. Quelques années plus tard, des systèmes microfluidiques basées sur la séparation par CE couplées à la spectrométrie de masse (MS) à nébulisation électrostatique ont été décrits dans la littérature [4-8]. Ces systèmes ont combinés les avantages des séparations à l'échelle miniaturisée avec ceux de la détection sélective par MS. Plus récemment, dans les systèmes microfluidiques couplés à la MS, les techniques de séparation comme l'électrophorèse capillaire en milieu micellaire (MEKC) [9, 10], l'électrochromatographie [11, 12] ou les séparations bidimensionnelles (MEKC-CE [13] ou encore l'extraction en phase solide – CE [14]), ont permis une augmentation globale de la capacité chromatographique.

Les faibles volumes d'injection, de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-9} L, imposés dans les systèmes microfluidiques employant la séparation basée sur CE, ne permettent pas d'attendre des limites de détection nettement inférieures à μM . L'introduction des techniques de pré-concentration de l'échantillon, comme l'isotachophorèse [15, 16], l'adsorption en phase à polarité inversée (RP) [17, 18] ou la dialyse sur une membrane avec perméabilité sélective [19, 20], a permis de réduire les limites de détection jusqu'à environ 1 nM.

Dans les études protéomiques, un certain intérêt a été soulevé pour les plateformes microfluidiques couplés à la MS et utilisant l'ionisation par désorption laser avec matrice (MALDI). Cette technique offre des avantages importants, entre autre la

possibilité d'effectuer plusieurs séparations en parallèle et d'augmenter ainsi le rendement des analyses [21-23]. Un système microfluidique de type MALDI/MS pour des analyses à haut volume est déjà disponible commercialement. Il a été développé sous forme d'un disque compact qui comporte 96 canaux distincts de séparation [24]. Dans ce système les échantillons sont déposés dans des microréservoirs situés au milieu du disque et l'action de la force centrifuge les déplace vers l'extérieur de celui-ci. Durant leur chemin ils sont digérés par la trypsine, séparés et finalement collectés au bout de chaque colonne. La limite de détection atteinte de ce système, pour des volumes d'échantillon de départ de $1\mu\text{L}$, a été de 0.5 nM . Récemment, l'utilisation de la déposition de l'échantillon par nébulisation électrostatique lors des analyses MALDI/MS a permis une amélioration de la reproductibilité des analyses suite à une meilleure homogénéité de la morphologie de l'échantillon [25].

Plus récemment on a porté un plus grand intérêt à l'intégration de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à polarité de phases inversées (une technique très souvent employée dans les analyses protéomiques), sur des puces couplées à la ESI-MS. À cause de la facilité de fabrication, les premiers micromodules ont été réalisés par dérivation de la paroi des canaux [26] ou par la photopolymérisation initiée par radiation UV, ou encore avec l'utilisation de phase stationnaire monolithe à l'intérieur d'un micro canal [21-23, 27]. Les microsystèmes comportant des phases stationnaires monolithes ont démontré une haute résistance mécanique et une basse résistance à l'écoulement de liquides avec un risque réduit d'obstruction. Cependant, ils ont une capacité de charge plus petite par rapport aux systèmes microfluidiques utilisant des particules traditionnelles de phase stationnaire. La phase stationnaire particulière a aussi été employée pour faire des séparations chromatographiques à une échelle miniaturisée et différentes techniques ont été utilisées pour l'introduction des liquides à travers des microcanaux. Par exemple, un système microfluidique de pompage comportant des microvalves et basé sur le flux électroosmotique (EOF) a été rapporté pour une microplateforme LC-ESI/MS [28, 29]. Ce microsystème a été fabriqué en verre par photolithographie avec gravage chimique à l'eau forte. Il comporte des pompes, des valves, une colonne chromatographique à phase à polarité inversée de 2 cm de longueur et $50\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur remplie des particules de $5\mu\text{m C}_{18}$, et un émetteur

d'électronébulisation, le tout intégré sur la même plateforme (0.5 in x 2.5 in). Dans le cadre d'une étude des biomarqueurs associée à la lignée cellulaire MCF7 du cancer du sein, ce microsystème a fourni une capacité chromatographique de 80 à 100 avec des performances chromatographiques similaires à celles observées avec un système commercial nano-LC utilisant les mêmes conditions d'analyse. Un autre type de système de pompage utilisé dans un système LC microfluidique complètement intégré [30-32] a été basé sur l'électrolyse. Ce microsystème comporte deux pompes électrochimiques pour le chargement d'échantillon et la formation du gradient nécessaire à la séparation, un réservoir pour l'uniformisation du gradient, des microfiltres, une pré-colonne (80 μm x 20 μm x 1cm) et une colonne chromatographique (80 μm x 20 μm x 4cm) remplie de particules de 3 μm C₁₈, et un émetteur d'électronébulisation. Ce système microfluidique a été évalué pour la séparation d'un mélange des peptides et ses performances chromatographiques étaient comparables à celles du système commercial nano-LC.

Un important défi pour les systèmes microfluidiques couplés à la spectrométrie de masse par nébulisation électrostatique, est la fabrication de l'émetteur d'électronébulisation afin d'obtenir un cône de Taylor stable ayant une haute efficacité d'ionisation. Au début du développement des microsystèmes – ESI/MS, le couplage était fait directement à l'extrémité du microcanal de séparation [5]. Cependant, la tension de surface du substrat (d'habitude fait en verre) n'était pas suffisamment élevée et compromettait la stabilité du cône de Taylor et diminuait la sensibilité et la résolution des analyses. Pour améliorer la stabilité et l'efficacité de l'électronébulisation, les extrémités des microsystèmes ont été recouvertes avec des matériels hydrophobes [33]. D'autres approches ont utilisés émetteurs capillaires insérés directement au bout du microcanal de séparation par une jonction liquide ou par un manchon [7, 34-37]. Même si les émetteurs capillaires couplés aux puces permettent d'obtenir des performances similaires à celles observées pour les séparations faites sur des microcolonnes conventionnelles, les problèmes d'alignement entre le canal de séparation et l'émetteur du spray conduisent souvent à un volume mort important [37]. Pour palier à cet effet, on a conçu des systèmes microfluidiques ayant un émetteur d'électronébulisation pointu, intégré dans le corps de la puce [38-41]. Ce type d'émetteurs permet d'obtenir un faisceau d'électronébulisation stable et une haute efficacité d'ionisation.

L'intégration d'un système chromatographique comprenant une colonne de préconcentration, une colonne analytique, et un émetteur d'électronébulisation apporte une réduction significative des volumes morts, des lignes de transfert et des connections, se traduisant par une amélioration des performances chromatographiques, de la fiabilité et de la facilité d'utilisation du système. La miniaturisation de la colonne chromatographique augmente la sensibilité d'analyse par une meilleure concentration des bandes d'analytes [42], tout en minimisant la quantité d'échantillon requis. Un système, nommé puce nano-HPLC, qui comporte tous les éléments nécessaires pour l'enrichissement, la séparation et l'ionisation des échantillons sur une seule puce [43, 44] a été conçu par Agilent Technologies. Des comparaisons entre les performances analytiques de la puce nano-HPLC et le système nano HPLC conventionnel ont montré que la puce nano-HPLC offre une réduction du temps d'analyses, une amélioration de la résolution chromatographique et une meilleure couverture de la séquence des protéines identifiés (17% de plus pour 300 fmoles d'albumine sérique bovine (BSA) digérée) [45, 46]. Une augmentation d'un facteur d'au moins 5 de la sensibilité du système microfluidique nano-HPLC-MS par rapport à celui conventionnel a été obtenue pour l'analyse protéomique de biomarqueurs [47]. Dans une autre étude, le couplage de la puce nano-HPLC avec un analyseur de masse à temps d'envol à accélération orthogonale (ao-TOF) a permis l'identification de plus de 200 oligosaccharides différents à partir du lait maternel humain [48]. Ce projet relie les nécessités imposées par les analyses protéomiques des extraits cellulaires complexes avec les avantages du système microfluidique intégré puce nano-HPLC basé sur la séparation par HPLC et la détection par ESI-MS.

1.3 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique très puissante utilisée pour l'identification des composés inconnus, pour la quantification des composés connus et aussi pour l'élucidation de la structure chimique des molécules. Le principe d'analyse est basé sur la mesure de la masse des molécules individuelles qui se trouvent chargées en phase gazeuse (par leur rapport masse sur charge).

À la suite d'une multitude d'innovations et des développements, la MS est devenu au cours des dernières décennies, un outil indispensable dans les domaines comme la chimie, la pharmacie, la médecine, la biologie moléculaire et cellulaire, et la biochimie. L'introduction de la technique d'ionisation par désorption laser avec matrice (MALDI) en 1988 [49] et de la technique d'ionisation par nébulisation électrostatique (ESI) en 1989 [50], a révolutionné l'étude des biomolécules par MS. De plus, des avantages comme la haute sensibilité, la haute précision de masse (i.e.: sélectivité), la possibilité de séquencer et d'identifier les peptides, ainsi que la possibilité d'identifier des modifications post-traductionnelles, ont propulsé la MS comme une technique de choix dans les études protéomiques.

1.3.1 Ionisation par nébulisation électrostatique

La technique d'ionisation par nébulisation électrostatique à pression atmosphérique a été développée par Fenn et al. [50]. L'ESI (figure 1.1) a permis le couplage direct des techniques de séparation par CE et HPLC à la MS, par le simple transfert des molécules chargées de la phase liquide à la phase gazeuse.

L'ESI consiste en l'application d'un fort champ électrique sur un liquide (les analytes dissouts en solution) qui traverse à faible débit un tube capillaire. La polarité du voltage appliqué détermine le mode positif ou négatif dans lequel l'analyse est réalisée. Le champ électrique provoque une accumulation des charges dans la solution située au bout du capillaire. Le cône de Taylor et un fin pinceau de gouttelettes chargées se forment à l'extrémité de l'émetteur. À la suite de l'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes et par la collision avec les molécules environnantes à pression atmosphérique, la taille des gouttelettes diminue et la densité des charges augmente

jusqu'au moment où elles atteignent la limite de Rayleigh donnant suite à une explosion Coulombique. À ce moment les forces coulombiennes répulsives sont plus grandes que les forces de tension de surface maintenant l'intégrité de la gouttelette [51]. À la suite des explosions coulombiennes successives, les ions sont expulsés de ces microgouttelettes par l'évaporation complète [52] ou par la désorption du champ [53].

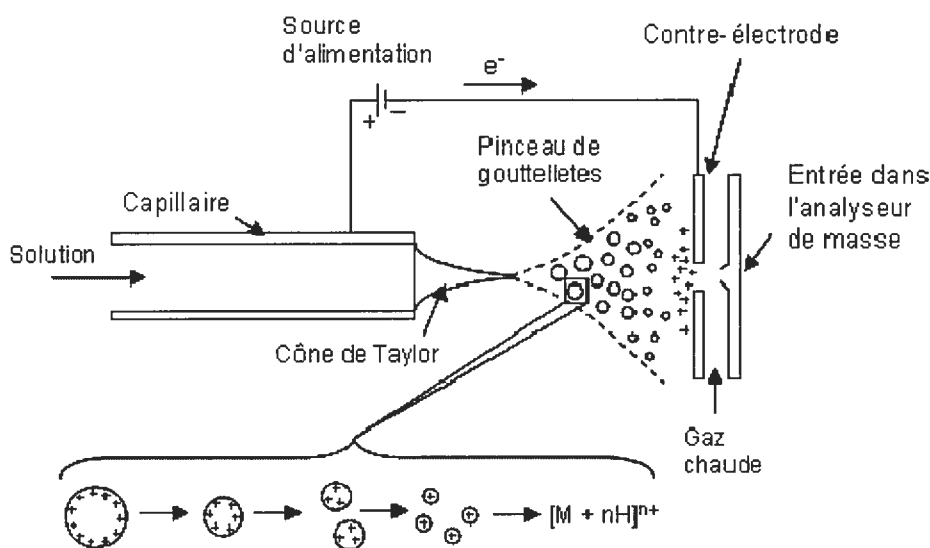


Figure 1.1 La formation des ions positives desolvatés par ESI.

La stabilité du pinceau de gouttelettes obtenu et celle du signal ionique correspondant, est influencée par le voltage appliqué, le débit d'échantillon et la taille de l'émetteur. Plus la taille de l'émetteur est petite et plus le débit est faible, l'efficacité de l'ionisation est améliorée et la sensibilité des analyses augmente. L'utilisation des débits de l'ordre du nL/min et des émetteurs d'une taille très réduite (quelques μm) a conduit au développement des sources d'ionisation "nanospray" permettant un rendement d'ionisation de deux ordres de grandeur supérieur à l'ionisation par nébulisation électrostatique conventionnelle [54].

Cette technique d'ionisation est largement répandue non seulement à l'analyse des biomolécules ayant un poids moléculaire jusqu'à 200 kDa, mais également dans l'étude des petites molécules.

1.3.2 Analyseur de masse à temps d'envol

L'analyseur de masse à temps d'envol (TOF) est un instrument souvent utilisé pour faire des analyses protéomiques d'expression différentielle et permet d'obtenir une transmission ionique très élevée, une haute sensibilité et une gamme d'analyse (rapport masse sur charge, m/z) théoriquement illimité. Le principe de l'analyseur TOF est illustré d'une manière schématique dans la figure 1.2.

Les ions qui sortent de la source d'ionisation sont accélérés vers un tube de vol par l'application d'une différence de potentiel entre une électrode et une grille d'accélération. Dans cette région d'accélération tous les ions acquièrent la même énergie cinétique mais auront des vitesses différentes. Une fois entrés dans le tube d'envol qui est une zone libre de champ, les ions sont séparés en fonction de leur vitesse, donc en fonction du rapport m/z , et ils vont atteindre le détecteur dans l'ordre croissant de leur rapport m/z .

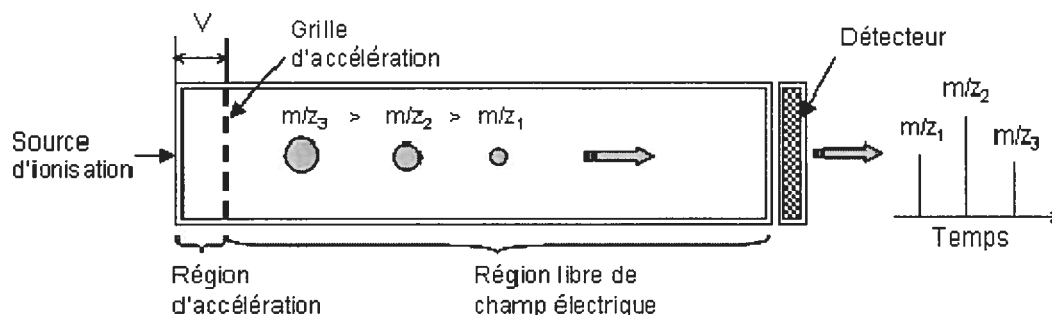


Figure 1.2 Schéma d'analyseur TOF.

La séparation temporelle des ions dans le tube d'envol d'une longueur L , est définie par l'équation suivante:

$$t = \sqrt{\frac{m}{2zeV}} \cdot L \quad (1.1)$$

où : m = masse de l'ion

t = temps d'envol

z = charge de l'ion

e = charge de l'électron

L = longueur du tube d'envol

V = voltage d'accélération

L'analyseur TOF linéaire a une résolution de masse relativement faible à cause de la dispersion du temps de vol des ions possédant le même rapport m/z . Cette dispersion, causée par des facteurs comme la distribution temporelle, la distribution spatiale et la distribution en énergie cinétique des ions dans la source [55], peut être minimisée en employant un réflectron. Ce dernier, joue un rôle de miroir d'ions en réfléchissant ceux-ci le long de leur parcours initial. Il permet la focalisation temporelle des ions de même m/z , quelles que soient leurs énergies cinétiques initiales et permet d'obtenir une plus grande résolution. L'analyseur TOF exige que les ions soient produits par paquets successifs. Pour répondre à ceci, une technique nommée "accélération orthogonale" ou "injection orthogonale" (donc oa-TOF), a été développée afin de permettre le couplage des sources d'ionisation continues (comme ESI) avec l'analyseur TOF [56]. En employant cette technique, l'échantillonnage discontinu du faisceau ionique continu produit par la source ESI peut être effectué efficacement en défléchissant les ions dans une direction orthogonale à leur parcours initial. Un analyseur de masse à temps d'envol avec réflectron et à injection orthogonale (oa-TOF) est présenté de façon schématique dans la figure 1.3.

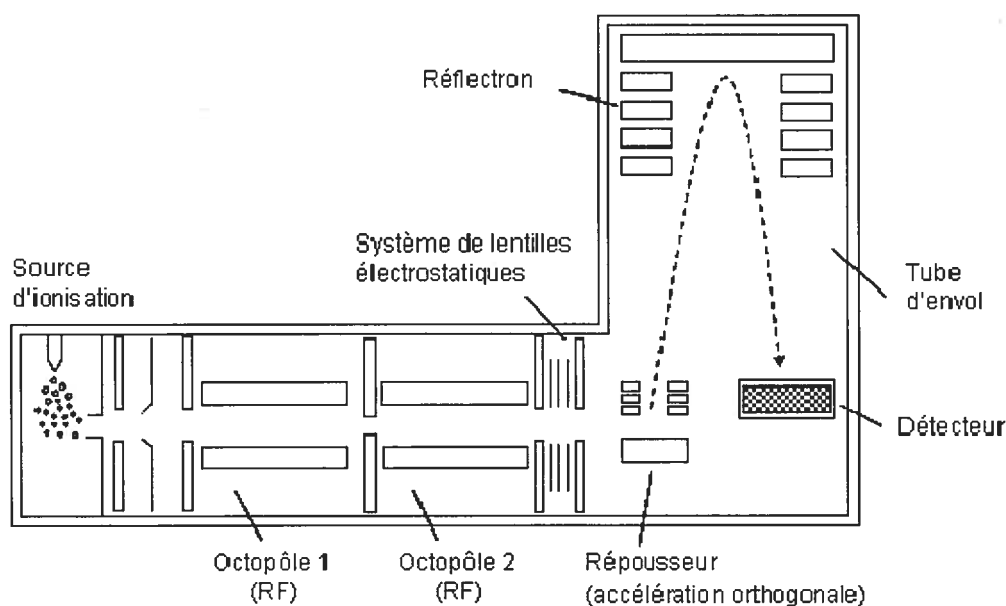


Figure 1.3 Schéma d'un analyseur de masse oa-TOF.

Les avantages de l'analyseur oa-TOF sont: une haute sensibilité due à une très grande transmission (200 amoles) [57], une haute résolution ($m/\Delta m \approx 10000$), une haute exactitude de masse (< 5 ppm avec une calibration interne et ± 30 ppm avec une calibration externe), le design compact et une très bonne fiabilité.

1.3.3 Analyseur de masse trappe ionique

L'analyseur de masse trappe ionique, connu aussi sur les noms de "quadrupole ion trap" ou "quistor", est basé sur le principe de piégeage des ions dans un espace (la trappe ionique) comportant une électrode centrale sous forme d'anneau et deux électrodes terminales sous forme de calottes sphériques (figure 1.4).

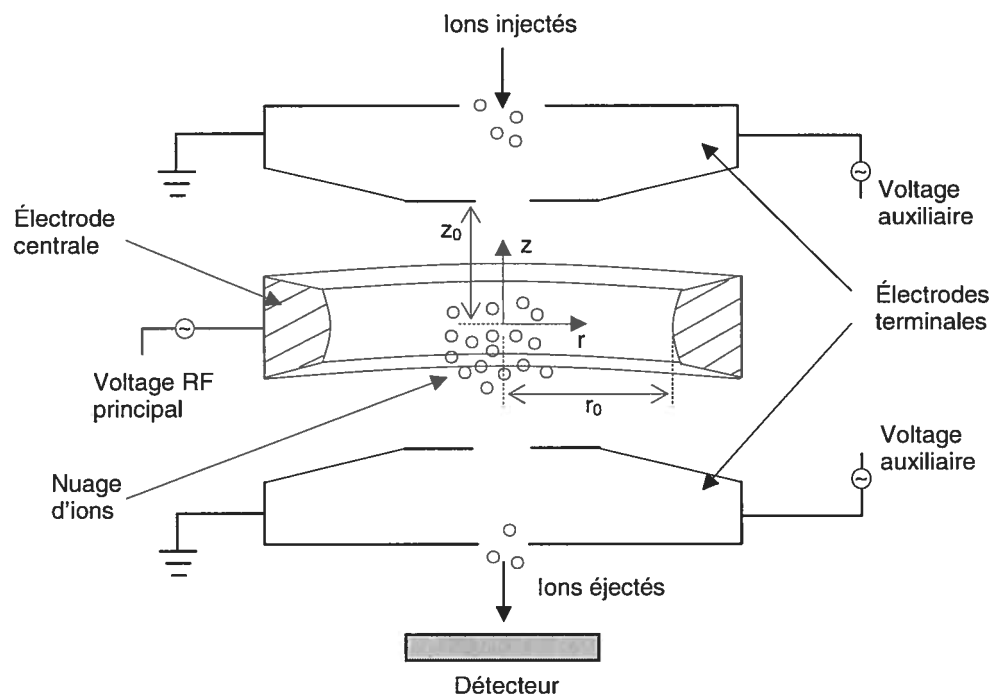


Figure 1.4 Schéma de la trappe ionique.

Les ions entrent et sortent de la trappe ionique par les orifices qui se trouvent au milieu de chaque électrode terminale. À l'intérieur de la trappe ionique on induit aux ions une trajectoire stable en appliquant un voltage radiofréquence (RF) sur l'électrode centrale. Pour en maximiser l'efficacité, un gaz tampon tel que l'hélium est employé afin de concentrer les ions vers le centre de la trappe ionique où le champ électrique est

optimal et moins distorsionné. En fonction de la valeur du voltage RF, le champ électrique trappe les ions d'un domaine m/z particulier.

Le domaine de stabilité des ions dans la trappe ionique est représenté par l'équation de Mathieu :

$$\frac{d^2 u}{d\xi^2} + (a - 2q \cdot \cos 2\xi) \cdot u = 0 \quad (1.2)$$

$$\xi = \frac{\omega t}{2} \quad a = \frac{8eU}{mr_0^2 \omega^2} \quad q = \frac{4eV_{RF}}{mr_0^2 \omega^2} \quad \text{pour: } r_0^2 = 2z_0^2 \quad (1.3)$$

où: m = masse de l'ion

e = charge de l'électron

ω = fréquence angulaire

t = temps

U = tension continue

V_{RF} = amplitude du voltage RF

r_0 = rayon de l'électrode centrale

z_0 = moitié de la distance entre les deux électrodes terminales

À l'intérieur de la trappe ionique les ions sont stables quand la valeur du paramètre q se situe entre 0.3 et 0.9 (figure 1.5) [58]. Une caractéristique importante de l'analyseur trappe ionique est la densité de charge à l'intérieur de la trappe. Une charge exagérée entraîne une perte de résolution et donc une imprécision sur la masse mesurée. Pour minimiser cet effet, un dispositif mesure le flux d'ions produits et ajuste en conséquence le temps d'accumulation des ions dans la trappe.

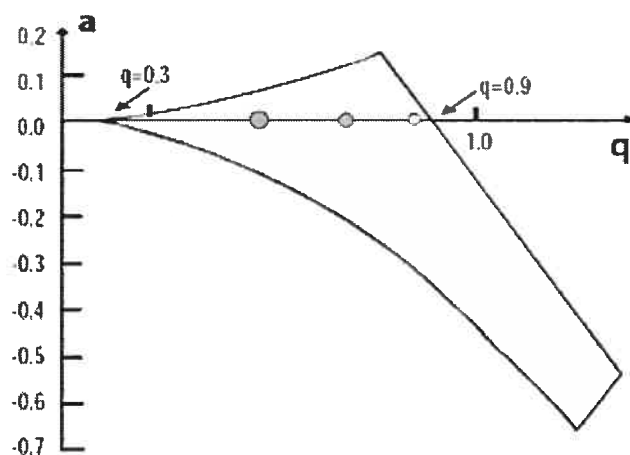


Figure 1.5 Diagramme de stabilité des ions pour une trappe ionique, reproduit de [58].

La trappe ionique peut être opérée dans le mode d'instabilité sélective en masse où les électrodes terminales sont mises à la terre et le voltage RF à l'électrode centrale est augmenté progressivement (dans ce cas $a = 0$), ou dans le mode d'injection résonante où aux électrodes terminales est appliqué un voltage auxiliaire. En utilisant un mode ou l'autre il est possible de déstabiliser les ions et de les éjecter de la trappe ionique successivement d'après leurs masses croissantes ou d'accumuler un ion spécifique dans la trappe. Il est aussi possible d'accumuler un ion, de le fragmenter et ensuite d'enregistrer ses fragments suite à l'application d'une longueur d'onde d'excitation aux électrodes terminales. Cette dernière étape, on peut la répéter successivement de façon à obtenir des analyses consécutives des ions fragments (spectrométrie de masse en tandem, MS^n). La fragmentation des ions isolés dans la trappe ionique pour analyses MS en tandem, se fait par décomposition induite par collision à basse énergie (CID). Afin d'améliorer les analyses MS en tandem, un mode "data dependent" est employé au cours d'une analyse LC- MS^n . Pendant un balayage complet les masses des composantes qui éluent sont mesurées et ensuite les ions les plus intenses sont sélectionnés pour fragmentation.

La trappe ionique est un analyseur de masse qui permet de faire des analyses MS et MS^n , d'obtenir une haute sensibilité pour les ions fragments suite à leur accumulation à l'intérieur de la trappe ionique, et aussi d'acquérir une haute résolution

pour un domaine étroit de m/z . De plus, cet analyseur est compact, fiable et moins cher que les autres types d'analyseurs en MS permettant des analyses MS en tandem.

1.3.4 Formation des ions fragments de basse énergie et identification des protéines par corrélation des spectres MS en tandem avec les banques de données

La fragmentation des ions formés dans la trappe ionique lors des analyses MS en tandem, survient suite à la décomposition induite par collision à basse énergie. La fragmentation des ions est initiée par la collision des ions avec les atomes d'hélium. Le gain d'énergie potentielle suite à la collision est transformé en partie en énergie vibrationnelle. L'énergie cinétique des ions est de l'ordre de quelques eV seulement. Le mécanisme de fragmentation suit la voie qui nécessite le minimum d'énergie. Les fragments obtenus sont ensuite expulsés sélectivement de la trappe ionique et on obtient ainsi un spectre des ions fragments pour un précurseur sélectionné. Dans le cas du séquençage des peptides, les fragments typiquement observés sont ceux correspondant au bris du lien peptidique entre les acides aminés, (figure 1.6) [59]. On désigne les ions fragments de la série "b" si la charge est localisée sur le fragment N-terminal du peptide, alors que les ions de la série "y" présentent la charge sur le fragment C-terminal du peptide. Le nombre en indice correspond au nombre d'acides aminés contenus dans le fragment et la numérotation débute avec l'acide aminé N-terminal, pour les fragments b [60, 61]. Les ions fragments de type "b" et "y" peuvent facilement perdre une molécule d'eau ou d'ammoniaque à partir des groupes fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés. Ces ions se retrouveront aussi dans le spectre MS-MS.

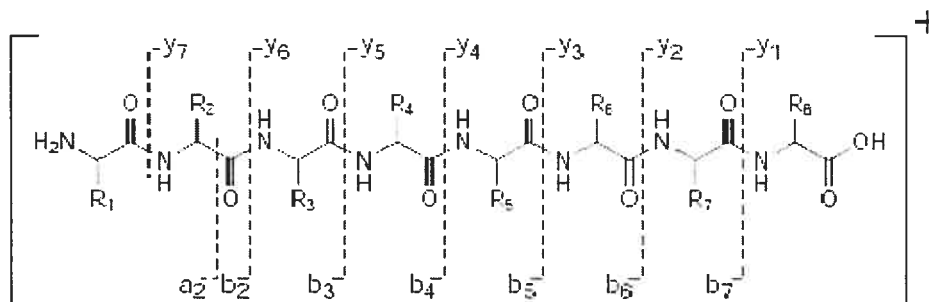


Figure 1.6 Fragmentation des peptides par CID, reproduit de [59].

Un autre type de fragment observé en basse énergie correspond aux fragments “a” obtenues suite à la perte de carbonyle ($C=O$) des fragments “b” cependant, l’ion fragment “a” est observé seulement pour l’ion “b₂” (“a₂”) [59]. La formation d’un ion “a” à partir d’un ion fragment de type “b” est plus favorable quand le résidu C-terminal de l’ion “b” est une histidine, une tyrosine, une phénylalanine, une isoleucine, une tryptophane, une cystéine carboxyméthylée, une leucine, ou une valine [62]. La différence de masse entre les ions fragments consécutifs d’une même série permet de déterminer l’identité des acides aminés consécutifs et donc de connaître la séquence du peptide.

L’interprétation des spectres MS-MS peut se faire manuellement ou en employant des moteurs de recherche. À partir des fragments obtenus par l’analyse MS en tandem, les moteurs de recherche (par exemple: Mascot (Matrix Science, Londres, Angleterre), Spectrum Mill (Agilent Technologies), ProteinLynx (Waters Micromass), Sequest (Thermo Finnigan)), vont générer des séquences d’acides aminés. Une identification réussie est possible même si l’outil détecte seulement une séquence partielle des acides aminés. Les séquences seront ensuite comparées aux protéines dans des banques de données afin d’identifier les protéines présentes dans l’échantillon de départ. La figure 1.7 montre la page d’enregistrement de la recherche MS-MS pour le moteur de recherche Mascot. Le fichier généré par le MSD-Ion Trap XCT Ultra contient une liste avec les valeurs des rapports m/z et des charges des ions précurseurs ainsi que les valeurs m/z et les intensités de tous les ions fragments correspondants. Ce fichier est téléchargé en mémoire par le moteur Mascot à partir de cette page. Les paramètres de recherche, comme le type de banque de données, la taxonomie de l’échantillon, le type d’enzyme utilisé pour faire la protéolyse, les modifications fixes ou/et variables, la tolérance de masse pour les ions parents et pour les ions fragments, le type de spectromètre de masse utilisé, etc., sont également sélectionnés à cette page. Après que tous les paramètres ont été choisis le moteur de recherche générera les séquences d’acides aminés pour chacun des spectres MS en tandem. Les séquences générées sont par la suite comparées à celles de banques de séquences de protéines afin d’obtenir une liste des candidats identifiés avec leur pointages ou taux de faux positifs.

Matrix Science - Mascot - MS/MS Ions Search - Windows Internet Explorer

http://mascot.inr.ca/mascot/cgi/search_form.pl?

File Edit View Favorites Tools Help

Matrix Science - Mascot - MS/MS Ions Search

MATRIX SCIENCE HOME: MASCOT:HELP Search Go

Mascot > MS/MS Ions Search

MASCOT MS/MS Ions Search

Your name Email

Search title

Database

Taxonomy

Enzyme

Allow up to missed cleavages

Fixed modifications

- Acetyl (K)
- Acetyl (N-term)
- Amide (C-term)
- Biotin (K)
- Biotin (N-term)

Variable modifications

- Biotin (N-term)
- Carbamidomethyl (C)
- Carbamyl (K)
- Carbamyl (N-term)
- Carboxymethyl (C)

Protein mass kDa

ICAT ☐

Peptide tol. \pm Da

MS/MS tol. \pm Da

Peptide charge

Monoisotopic ☒ Average ☐

Data file

Data format

Precursor m/z

Instrument

Overview ☐

Report top hits

Copyright © 2005 Matrix Science Ltd. All Rights Reserved.

Figure 1.7 Page montrant les paramètres de recherche MS-MS du moteur Mascot.

1.4 Méthodes instrumentales

La figure 1.8 montre le système nano Series 1100 LC/MSD TOF (Agilent Technologies) utilisé lors de l'évaluation des performances chromatographiques du système microfluidique ainsi que pour faire les analyses protéomiques différentielles. Le système comporte une pompe isocratique utilisée pour l'injection d'échantillon, une pompe nano employée pour l'élution des peptides ou des protéines, l'interface du système microfluidique (soit le prototype Rev 3 soit la version commerciale "chip-cube") et un oa-TOF comme analyseur de masse.

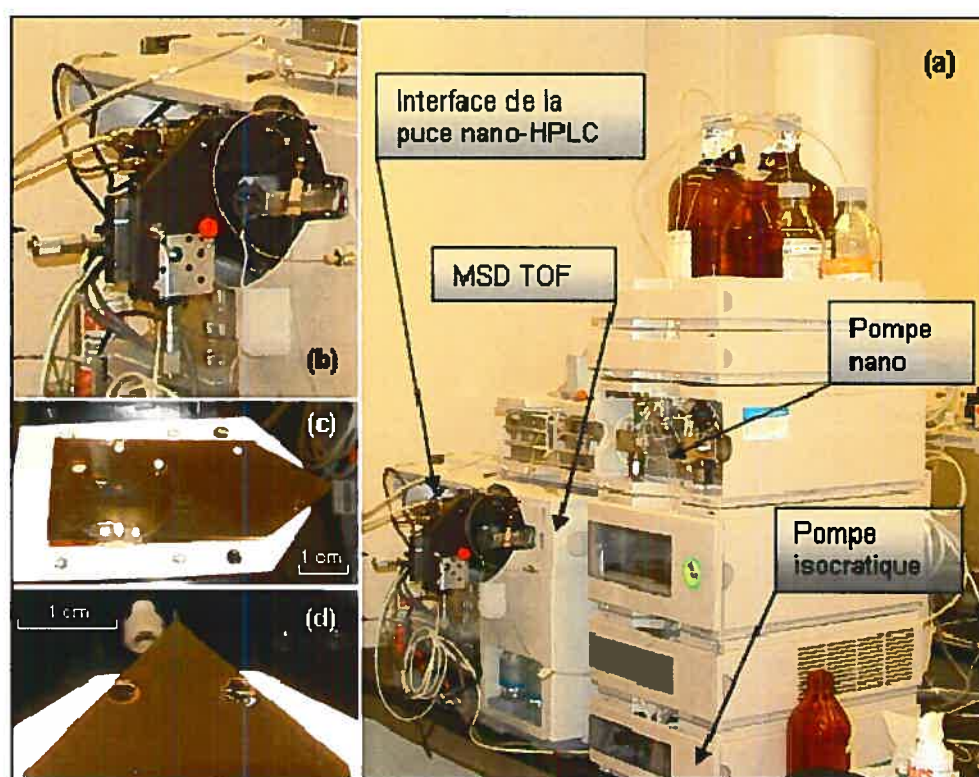


Figure 1.8 Système nano Series 1100 LC/MSD TOF (Agilent Technologies) avec le prototype Rev 3 de l'interface du système microfluidique (a); interface de la puce nano-HPLC (b); puce nano-HPLC (c); bout de la puce avec l'émetteur d'électronébulisation (d).

Un système nano Series 1100 LC/MSD Ion Trap (Agilent Technologies) a été utilisé lors de l'identification des protéines. Celui-ci (figure 1.9) comporte une pompe capillaire pour l'injection d'échantillon, une pompe nano pour l'élution des

peptides, l'interface de la puce nano-HPLC (soit le prototype Rev 3 soit la version commerciale "chip-cube") et une trappe ionique en tant qu'analyseur de masse.

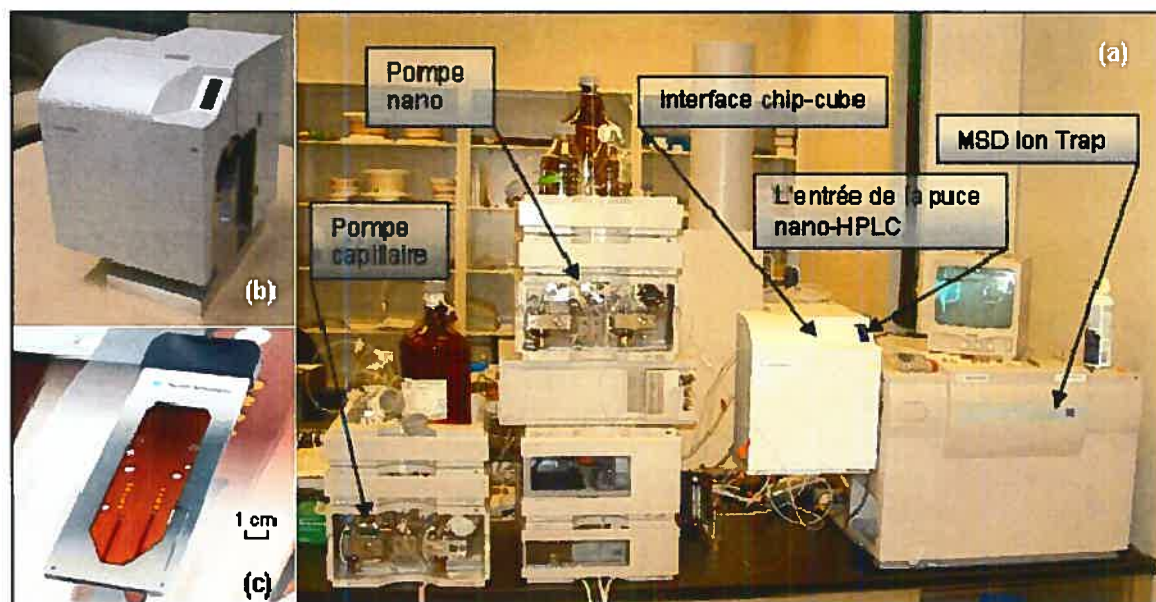


Figure 1.9 Système nano Series 1100 LC/MSD Ion Trap (Agilent Technologies) avec l'interface "chip-cube" du système microfluidique (a); interface chip-cube de la puce nano-HPLC (b); puce nano-HPLC encapsulée (photo reçue d'Agilent Technologies) (c).

La séparation des peptides ou des protéines a été effectuée sur le système microfluidique puce nano-HPLC (Agilent Technologies). Ce microsystème, plus petit qu'une carte de crédit et intègre les composantes conventionnelles de la technique de séparation par chromatographie liquide nano: une pré-colonne, une colonne chromatographique et un émetteur d'électronébulisation (Figure 1.10).

La puce nano-HPLC est fabriquée [44] en plusieurs couches de film de Kapton® dans lequel on a gravé des canaux microfluidiques, des trous d'entrée, et des colonnes par ablation laser UV. Les films de Kapton® sont ensuite laminés ensemble sous vide et par application de chaleur. L'émetteur du spray, de forme conique, ayant un bout circulaire, est modelé par ablation laser. Le diamètre interne de l'émetteur est de 10µm. Près de l'émetteur une couche de platine est déposée pour créer le contact électrique avec le canal d'élution de la solution. La pré-colonne et la colonne

chromatographique ont été remplies avec différentes phases stationnaires non polaires (C_{18} , C_3 , mRP-Protein) ayant différentes dimensions des particules (5 μm , 3.5 μm , 2.1 μm). Le type de phase stationnaire et les dimensions des particules employés pour chaque application sont mentionnés dans les chapitres correspondants.

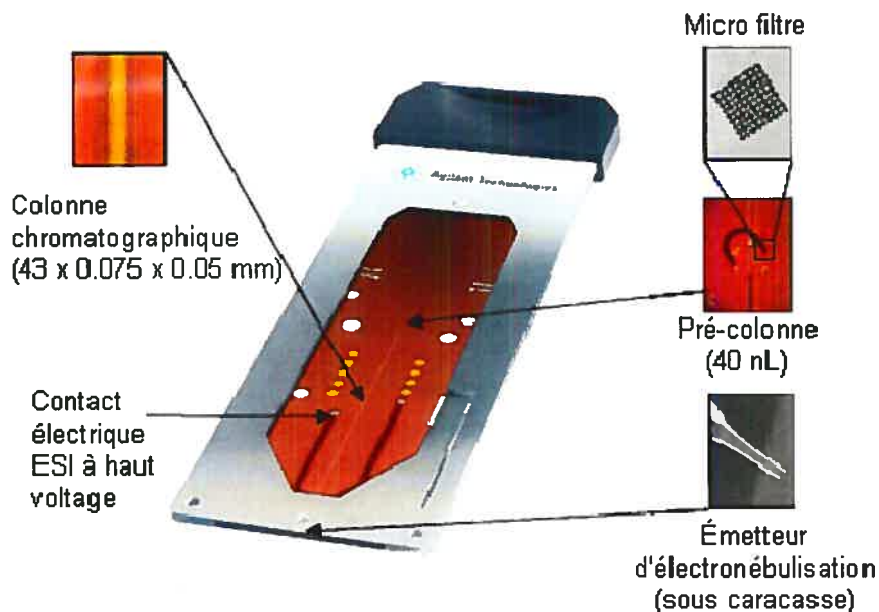


Figure 1.10 Puce nano-HPLC encapsulée.

La configuration standard de la puce nano-HPLC comporte une pré-colonne ayant un volume interne de 40 nL et une colonne chromatographique ayant une section transversale de 75 μm x 50 μm et une longueur de 4.3 cm. Une autre configuration du système microfluidique comprend une pré-colonne ayant un volume de 160 nL et une colonne analytique de 15 cm de longueur, permettant d'injecter une quantité plus élevée d'échantillon.

L'interface chip-cube de la puce nano-HPLC est complètement automatisée. La puce nano-HPLC est chargée à l'intérieur de l'interface, maintenue de façon hermétique entre le stator et le rotor d'une micro valve d'injection et positionné devant l'entrée du spectromètre de masse. La tension avec laquelle le système microfluidique est maintenue à l'intérieur de la micro valve est établie et contrôlée de façon automatique afin d'assurer une bonne étanchéité. La connexion entre les pompes

analytiques et les colonnes qui se trouvent sur le système microfluidique se fait par des ports d'entrée situés dans le stator et à l'aide des cannelures qui se trouvent à l'intérieur du rotor (figure 1.11).

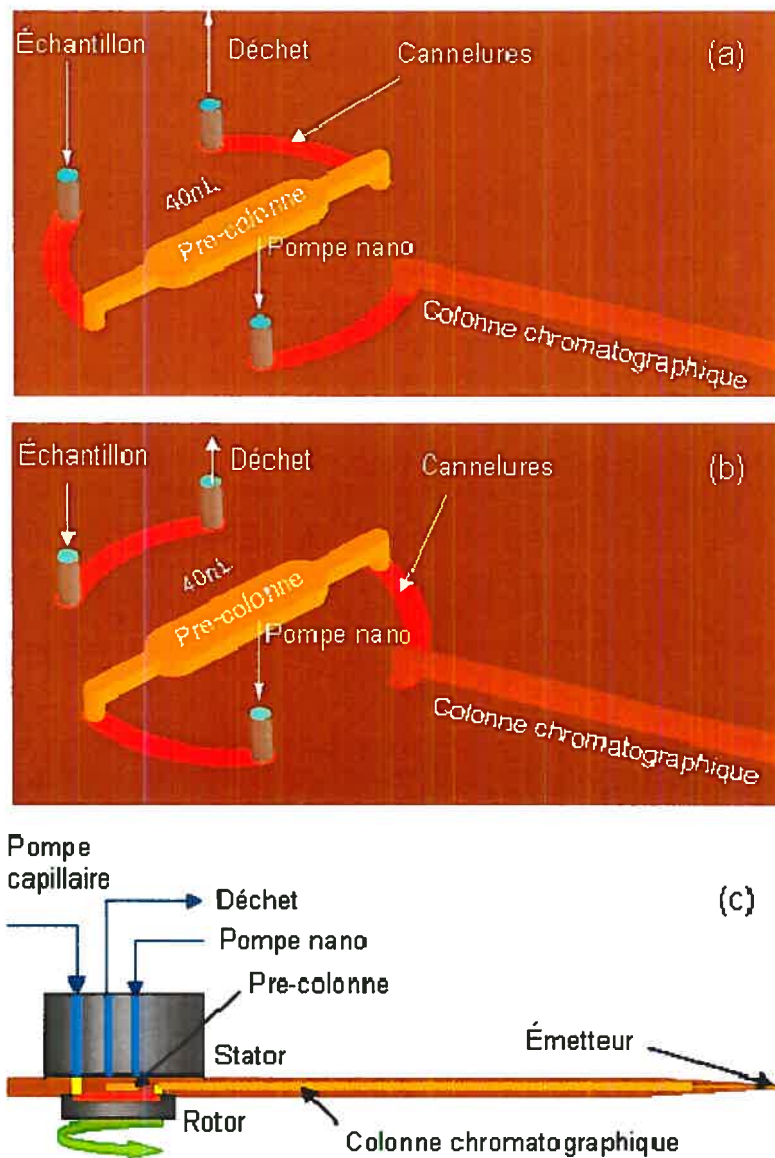


Figure 1.11 Schéma tridimensionnel de la puce nano-HPLC. (a) position du rotor à l'étape de chargement d'échantillon sur la pré-colonne ; (b) position du rotor à l'étape d'élution des peptides ; (c) vue latérale du système microfluidique encadré du rotor et du stator, reproduit de [63].

Le processus de séparation des peptides ou des protéines implique deux étapes. Dans la position de chargement d'échantillon, la pré-colonne est mise en ligne avec la pompe d'injection et avec le capillaire de transfert de déchet par les cannelures du rotor (figure 1.11a). Au cours de cette étape l'échantillon est concentré sur la pré-colonne et les sels présents dans l'échantillon sont éliminés vers les déchets. Le débit utilisé pour le chargement d'échantillon est de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Dans la position d'élution (figure 1.11b), la pré-colonne est mise en ligne avec la colonne chromatographique et la pompe nano introduit un mélange d'acétonitrile et acide formique 0.2% à 300 nL/min (le gradient utilisé dans chaque type d'analyse est décrit dans le chapitre correspondant). Pendant cette étape les peptides ou les protéines sont séparés selon leur hydrophobicité. Les molécules sont ionisées à la sortie de la colonne chromatographique suite à l'application d'un voltage à l'émetteur du spray. Ces ions sont ensuite séparés dans l'analyseur de masse selon leur rapport m/z .

Le passage d'une position à l'autre se fait très rapidement et de façon automatique, par la rotation du rotor de la micro valve d'injection en changeant la position des cannelures (figure 1.11c).

À l'intérieur de l'interface chip-cube du système microfluidique, une camera vidéo permet de vérifier la stabilité de l'électronébulisation.

2. L'évaluation de la capacité de charge du système microfluidique puce nano-HPLC et l'influence de la direction d'élution et de la température sur le processus de séparation

2.1 Introduction

En HPLC, la capacité de charge d'une colonne chromatographique est un paramètre important pour le processus de séparation. Celui-ci est défini comme étant la quantité de soluté injectée entraînant la saturation de la phase stationnaire contenue dans la colonne, et ce pour des conditions déterminées [64]. L'évaluation de la capacité de charge est une étape importante dans le processus de développement des systèmes chromatographiques comportant de nouvelles phases stationnaires ou de dimensions différentes [65-69]. Lorsque la capacité de charge d'une colonne chromatographique n'est pas dépassée, la largeur des pics à mi-hauteur reste constante. Lorsque la colonne est surchargée on observe un phénomène d'élargissement progressif des pics, accompagné d'une diminution de la résolution et des temps de rétention [70] ainsi qu'une distorsion de la forme des pics [68, 70, 71]. De plus, la réponse du détecteur est non linéaire après la surcharge de la colonne [70]. On a aussi démontré que la capacité de charge en termes de quantité d'échantillon injectée, diminue avec l'augmentation de la masse moléculaire des composés et que cette variation est fonction de la nature de la phase stationnaire [66, 69]. Dans le cas des systèmes chromatographiques où l'échantillon, avant d'être séparé sur la colonne chromatographique, est pré-concentré sur une pré-colonne, il faut évaluer la capacité de charge de celle-ci. Pour ces systèmes, le chargement d'échantillon sur la pré-colonne peut se faire dans la même direction que l'élution d'échantillon de la pré-colonne vers la colonne de séparation (élution "forward-flush") ou dans le sens contraire (élution "backward-flush"). Plusieurs études rapportent l'utilisation d'un mode d'élution ou de l'autre [72-75]. En séparant un mélange de peptides sur une pré-colonne C_{18} (particules de 40 μm) couplée en ligne avec une colonne de séparation C_{18} (particules de 3 μm), Pascual et al. [76] ont conclu que l'élution "backward-flush" donne une re-focalisation effective des peptides retenus sur la pré-colonne, dans des bandes relativement étroites. Ils ont observé une nette perte d'efficacité de séparation en employant l'élution "forward-flush". Par contre, Mallet et al. [77], en employant une pré-colonne C_{18} (particules de 25 μm) et une colonne de séparation C_{18} (particules de 5 μm) ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux modes d'élution pour la séparation d'un médicament basique contenu dans du plasma de rat. Beaucoup de chercheurs ont choisi d'utiliser l'élution "backward-

flush” puisque ce mode permet une vie plus longue de la pré-colonne par rapport à l’élution forward-flush [77-79].

Un autre paramètre très important pour l’HPLC ayant attiré l’attention des chercheurs depuis quelques décennies est la température de séparation. Dans les années 60, Giddings [81] a remarqué que l’augmentation de la température réduit le coefficient de diffusion et pour la majorité des débits employés en HPLC, le nombre des plateaux augmente et les pics sont plus étroits. Aussi, Snyder [82] a noté que dans la chromatographie en phase normale des températures réduites peuvent avoir une faible influence sur le coefficient de distribution. Plus tard, Snyder et Kirkland [83] mentionnent la modification de la température comme une technique de variation de la sélectivité et concluent que la température a une faible influence sur la sélectivité en chromatographie liquide - liquide ou liquide – solide, mais qu’elle joue un rôle plus important en chromatographie d’échange d’ions et de paires d’ions. Dans le même ordre d’idée, Rosset et al. [64] ont conclu qu’en chromatographie de partage sur phases stationnaires greffées, ce qui est chromatographie liquide – liquide, l’influence de la température sur la sélectivité est en général très faible mais qu’il est toutefois avantageux d’employer des températures plus élevées car la viscosité de la phase mobile diminue et l’efficacité des colonnes chromatographiques est améliorée de manière importante, pour un même débit de la phase mobile. En HPLC, la variation de température a été principalement utilisée pour contrôler le temps de rétention, c’est-à-dire qu’à des températures élevées nous obtiendrons des temps de rétention plus courts. Une protéine ou une polypeptide seront adsorbée (à pression et température constantes) selon la variation de l’énergie libre standard de Gibbs (ΔG^0) du système (équation 2.1). Puisque le processus d’adsorption des protéines ou des peptides aux surfaces chromatographiques est réversible, ΔG^0 est exprimé aussi en fonction de la constante d’équilibre du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile. En outre, le facteur de rétention (k) est proportionnel à la constante d’équilibre (équation 2.2). En combinant ces deux équations on obtient l’équation van’t Hoff (équation 2.3) qui décrit l’influence de la température sur le temps de rétention en termes des paramètres thermodynamiques. Elle est souvent utilisée dans des études thermodynamiques pour évaluer la contribution de l’entropie et de l’enthalpie sur la rétention.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K \quad (2.1)$$

$$k = K\phi \quad (2.2)$$

$$\ln k = -\left(\frac{\Delta H^0}{RT}\right) + \left(\frac{\Delta S^0}{R}\right) + \ln \phi \quad (2.3)$$

Où : K = constante d'équilibre d'un composé entre la phase stationnaire et celle mobile;

k = facteur de rétention;

ϕ = rapport des volumes de phase stationnaire et mobile;

ΔG^0 = énergie libre standard de Gibbs;

ΔH^0 = enthalpie standard de transfert de la phase mobile vers la phase stationnaire;

ΔS^0 = entropie standard de transfert de la phase mobile vers la phase stationnaire;

T = température absolue

R = constante des gaz

Le développement dans le domaine informatique et la fabrication des diverses phases stationnaires résistantes aux températures élevées ont ravivé l'intérêt sur l'influence de la température sur la sélectivité de la séparation. Plusieurs études ont porté sur l'optimisation de la sélectivité des processus de séparation en RP-HPLC, en variant simultanément la température et le gradient avec des logiciels de simulation [84-90]. Il a été montré que les modifications de sélectivité causées par la variation de la température sont complémentaires à celles établies par la variation de la force d'éluant. L'influence de la température sur le processus de séparation a été observée pour différentes classes de composés parmi lesquelles on compte les polymères et les surfactants [91, 92], les produits pharmaceutiques [93], les produits naturels [94], les peptides et les protéines [95-99], les isomères achirales [100], et les séries homologues [101]. Pour la séparation des protéines, Yang et al. [98] ont obtenu une meilleure efficacité à haute température en utilisant une phase stationnaire hautement réticulée -C₈, et très stable à températures élevées et en milieu acide. Pour étudier l'influence de la température sur l'efficacité de la séparation en RP-LC, Yang Y. [102] a développé un model mathématique. En utilisant des données rapportées dans la littérature dans son model, il a conclu qu'à une vitesse linéaire constante, à basse température, la séparation est influencée par le

transfert de masse pendant qu'aux températures élevées la diffusion longitudinale contrôle le phénomène d'élargissement des pics. C'est-à-dire, que la hauteur d'un plateau théorique diminue avec l'augmentation de la température pour des domaines de températures basses alors que l'inverse est observé pour des domaines de températures élevées.

Les analyses en HPLC employant une température élevée, demandent un control précis de la température de la colonne de séparation et des solvants utilisés pour faire l'élution. Une différence trop grande entre la température de la colonne et celle des solvants cause une diminution de la température moyenne de la colonne qui se traduit par une augmentation des temps de rétention et aussi par la formation des gradients radiaux de température qui favorisent l'élargissement des pics. Il a été démontré [103] qu'une différence de maximum $\pm 6^\circ$ entre la température des solvants et celle de la colonne de séparation peut minimiser ces effets. Les colonnes chromatographiques capillaires, ayant des dimensions réduites ont une basse capacité calorifique. En conséquence, les gradients de température radiaux sont moins importants par rapport aux colonnes conventionnelles. Ces gradients deviennent presque négligeables dans des systèmes microfluidiques et la différence entre la température des solvants et celle de la colonne de séparation n'a pas d'influence significative sur l'efficacité de la séparation.

L'utilisation d'une température élevée en chromatographie liquide apporte aussi d'autres avantages. Par exemple, une température élevée réduit la viscosité de l'éluant et en conséquence la pression sur le système diminue. On peut donc employer des débits plus élevés pour diminuer le temps d'analyse ou des colonnes plus longues pour augmenter le nombre de plateaux théoriques.

Dans ce chapitre, nous évaluerons la capacité de charge optimale du système microfluidique puce nano-HPLC. Nous évaluerons aussi l'influence de la direction d'élution et de la température sur les performances analytiques de la puce nano-HPLC.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Matériels

L'eau et l'acétonitrile (ACN) de pureté HPLC, ont été achetés de la compagnie Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). L'acide formique (FA) de pureté HPLC a été obtenu de la compagnie EM Science (Mississauga, ON, Canada). L'acide trifluoroacétique (TFA) de pureté HPLC a été acheté de SIGMA (St Louis, MO, É-U). Les digestats de huit protéines réduites et alkylées avec acétamide iodé (albumine sérique bovine, aldolase de lapin, alcool déhydrogénase de levure, catalase bovine, glyceraldehyde 3P déhydrogénase bovine, glycerokinase de *E. coli*, lactotransferrine humaine, lactoperoxydase bovine) ont été achetées de Michrom Bioresources (Auburn, CA, É-U).

2.2.2 Préparation des échantillons

Une solution mère de standards de huit protéines réduites et alkylées avec acétamide iodé (500 fmol/ μ L chaque protéine) et digérées a été préparée dans l'eau avec 5% ACN et 0.2% FA en mélangeant les digestats tryptiques individuels. À partir de la solution mère, une série de dilutions a été faite afin d'obtenir pour chacune des protéines du mélange aux concentrations finales suivantes: 250 fmol/ μ L, 50 fmol/ μ L, 25 fmol/ μ L, 5 fmol/ μ L, 2.5 fmol/ μ L et 0.5 fmol/ μ L. La solution employée pour faire les dilutions a été de l'eau avec 5% ACN et 0.2% FA. Le volume injecté sur la puce nano-HPLC a été de 5 μ L. En tenant compte de la masse moléculaire moyenne d'une protéine (0.05 ng/fmol) et de la présence des digestats de huit protéines dans le mélange, les quantités injectées sur le système microfluidique étaient de: 1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng et 1000 ng respectivement. Ces solutions ont été employées pour l'évaluation de la capacité de charge de la puce nano-HPLC munie d'une pré-colonne de 30 nL.

Pour l'évaluation de la capacité de charge de la puce nano-HPLC ayant une pré-colonne de 160 nL, une solution mère de standards des huit protéines réduites et alkylées (2500 fmol/ μ L chaque protéine) a été préparée dans l'eau avec 5% ACN et 0.2% FA en mélangeant les digests tryptiques individuelles. À partir de la solution mère, une série de dilutions a été faite afin d'obtenir pour chacune des protéines du mélange aux

concentrations finales suivantes: 1500 fmol/ μ L, 500 fmol/ μ L, 400 fmol/ μ L, 300 fmol/ μ L, 200 fmol/ μ L, 100 fmol/ μ L, 50 fmol/ μ L, 25 fmol/ μ L et 2.5 fmol/ μ L. La solution employée pour faire les dilutions a été de l'eau avec 5% ACN et 0.2% FA. Le volume injecté sur la puce nano-HPLC était de 5 μ L. Dans ce cas les quantités injectées étaient de: 5 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 400 ng, 600 ng, 800 ng, 1000 ng, 3000 ng et 5000 ng.

Pour l'étude de l'influence de la direction d'élution sur le processus de séparation, 5 μ L d'une solution 40 fmol/ μ L (chacune des mêmes huit protéines) ont été injectés en triplicata pour chaque condition.

Une autre solution mère des mêmes standards de huit protéines digérées (250 fmol/ μ L chaque protéine) a été préparé dans l'eau avec 5% ACN et 0.1% TFA¹ en mélangeant les digestats tryptiques individuels. À partir de la solution mère, une série de dilutions a été faite afin d'obtenir pour chacune des protéines du mélange les concentrations finales suivantes: 100 fmol/ μ L, 50 fmol/ μ L, 25 fmol/ μ L, 10 fmol/ μ L, 5 fmol/ μ L et 2.5 fmol/ μ L. La solution utilisée pour faire les dilutions a été de l'eau avec 5% ACN et 0.1% TFA. Les solutions préparées ont été entreposées à -30°C. Le volume injecté sur le système microfluidique, de chaque solution préparée était de 5 μ L et les quantités injectées étaient de: 5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng et 500 ng respectivement. Ces solutions ont été employées dans l'étude de l'influence de la température sur la séparation chromatographique.

2.2.3 Analyses puce nano-HPLC-MS

Le système microfluidique intègre une pré-colonne, une colonne chromatographique et un émetteur d'électronébulisation ayant un diamètre interne de 10 μ m. Dans le cadre des analyses de la capacité de charge, deux configurations de la puce nano-HPLC (Agilent Technologies) ont été employées. La première configuration comporte une pré-colonne de 30 nL et une colonne chromatographique de 45 mm de longueur, 75 μ m de largeur et 50 μ m de profondeur (volume de 170 nL), et fonctionne

¹ L'agent de pairage d'ions FA a été changé pour le TFA dans le but d'augmenter la sélectivité des analyses et l'affinité des peptides pour la phase stationnaire non polaire et d'obtenir une amélioration de la capacité chromatographique.

sur l'interface prototype Rev 3 du système microfluidique. La deuxième configuration comporte une pré-colonne de 160 nL et une colonne de séparation de 150 mm de longueur, 75 μ m de largeur et 50 μ m de profondeur (volume de 560 nL). Cette dernière configuration fonctionne sur l'interface chip-cube commercialisée par Agilent Technologies.

Pour l'étude de l'influence de la direction d'élution de la pré-colonne sur la séparation chromatographique, une puce nano-HPLC ayant une pré-colonne de 40 nL et une colonne de séparation de 43 mm de longueur a été utilisée avec l'interface chip-cube.

L'influence de la température sur la séparation des peptides a été évaluée en employant une puce nano-HPLC munie d'une pré-colonne de 30 nL et d'une colonne de séparation de 45 mm de longueur, et une interface prototype Rev 3 incluant un élément chauffant qui assure le contrôle de la température sur toute la surface du système microfluidique. Pour cette étude les analyses ont été effectuées aux quatre températures suivantes: 20 °C, 40 °C, 50 °C et 60 °C.

Toutes les analyses ont été réalisées sur un système nano 1100 Series LC couplé au spectromètre de masse MSD-TOF.

Les conditions chromatographiques expérimentales sont présentées dans le tableau 2.1. Avec l'interface prototype Rev 3 de la puce nano-HPLC on utilise pour le contrôle de la micro valve une méthode nommée "Méthode avec tableau du temps". Le temps de chargement doit être calculé en fonction du volume d'injection désiré. En tenant compte de ce paramètre, il faut préciser le temps quand la micro valve doit changer de position. Avec l'interface commercialisée chip-cube, on peut employer une méthode nommée "Méthode avec IFV (Injection Flush Volume)" [104] qui permet de calculer de façon automatique le temps nécessaire pour le chargement effectif de l'échantillon sur la pré-colonne. À la fin de cette période la micro valve est déplacée à la position d'analyse. Cette méthode élimine la nécessité d'ajuster manuellement la période de changement de position de la micro valve. Elle réduit aussi le temps d'analyse en utilisant le temps d'injection plus court.

Tableau 2.1 Conditions chromatographiques expérimentales pour l'évaluation de la capacité de charge et de l'influence de la direction d'élution et de la température.

Paramètres	Conditions expérimentales
<i>A) L'évaluation de la capacité de charge</i>	
Puces nano-HPLC:	
1. Pré-colonne :	Zorbax 300Å, 5 µm C ₃ , 30nL;
Colonne chromatographique:	Zorbax 300Å, 2.1 µm C ₁₈ , 170 nL;
2. Pré-colonne :	Jupiter 300Å, 4 µm C ₁₈ , 30 nL;
Colonne chromatographique:	Jupiter 300Å, 3 µm C ₁₈ , 170 nL;
3. Pré-colonne :	Zorbax 300Å, 5 µm C ₁₈ , 160 nL;
Colonne chromatographique:	Zorbax 300Å, 5 µm C ₁₈ , 560 nL;
Débit de chargement d'échantillon	4 µL/min
Phase mobile pour charger l'échantillon	H ₂ O avec 3% ACN et 0.2% FA
Volume d'injection	5 µL
Position de la micro valve de la puce nano-HPLC	0 min – chargement
(pour les puces de l'interface prototype Rev 3)	6 min – analyse
	69 min – chargement
Débit d'élution	300 nL/min
Phase mobile d'élution	A : H ₂ O avec 0.2% FA
	B : ACN avec 0.2% FA
Gradient:	chip avec une pré-colonne de 30 nL
	chip avec une pré-colonne de 160 nL
	(Méthode avec IFV, IFV = 3)
Temps (min)	%B
0	8
6	8
63	40
67	60
68	60
69	8
Temps (min)	%B
0	5
130	26
140	60
143	60
146	5

B) L'influence de la direction d'élution

Puce nano-HPLC:

Pré-colonne : Zorbax 300Å, 5 µm C₁₈, 40 nL;

Colonne chromatographique: Zorbax 300Å, 5 µm C₁₈, 170 nL;

Débit de chargement d'échantillon

4 µL/min

Phase mobile pour charger l'échantillon

H₂O avec 3% ACN et 0.2% FA

Volume d'injection

5 µL

Débit d'élution

300 nL/min

Phase mobile d'élution

A : H₂O avec 0.2% FA

B : ACN avec 0.2% FA

Gradient: Méthode avec IFV (IFV = 3)

Temps (min)	%B
0	5
62	40
66	60
67	60
68	5

C) L'influence de la température

Puces nano-HPLC:

Pré-colonne : Jupiter 300Å, 4 µm C₁₈, 30 nL;

Colonne chromatographique: Jupiter 300Å, C₁₈, 3 µm, 170 nL;

Débit de chargement d'échantillon

4 µL/min

Phase mobile pour charger l'échantillon

H₂O avec 3% ACN et 0.1% TFA

Volume d'injection

5 µL

Position de la micro valve de la puce nano-HPLC

0 min – chargement

(pour les puces de l'interface prototype Rev 3)

4 min – analyse

67 min – chargement

Débit d'élution

300 nL/min

Phase mobile d'élution

A : H₂O avec 0.2% FA

B : ACN avec 0.2% FA

Gradient: Méthode avec tableau du temps.

Temps (min)	%B
0	8
4	8
61	40
65	60
66	60
67	8

Solvant de lavage d'aiguille :

H₂O avec 20% MeOH et 0.2% FA

Les conditions d'opération du spectromètre de masse sont présentées dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 Conditions d'opération du spectromètre de masse MSD-TOF pour l'évaluation de la capacité de charge et de l'influence de la direction d'élution et de la température.

Paramètres	Conditions expérimentales
Mode d'ionisation	Positif
Fragmentor (V) :	180
Skimmer (V) :	70
OCT RF V (V) :	250
Température du gaz de séchage (°C) :	350
Débit de gaz de séchage (L/min) :	3.5
Domaine de balayage (m/z) :	400 – 1600
Voltage du capillaire (V)* :	
A) L'évaluation de la capacité de charge	
- puce nano-HPLC avec une pré-colonne de 30 nL	2300
- puce nano-HPLC avec une pré-colonne de 160 nL	1850
B) L'influence de la direction d'élution	1950
C) L'influence de la température	2200

*La différence entre les valeurs du voltage du capillaire appliqué aux prototypes puce nano-HPLC par rapport aux puces nano-HPLC commerciaux est d'environ 400 V, due aux améliorations dans le processus de fabrication du système microfluidique permettant d'obtenir la même efficacité d'ionisation.

2.2.4 Détection des peptides et analyse du regroupement

Les fichiers bruts (*.wiff) générés par le logiciel d'acquisition du oa-TOF ont été traités en employant un logiciel maison pour la détection des peptides. Ce logiciel attribue à chaque ion les coordonnées suivantes : rapport m/z , temps de rétention, largeurs des pics, intensités et charge. Seulement les intensités ayant une valeur au-dessus d'un certain seuil pré-établi par l'utilisateur (typiquement de 300 counts pour le oa-TOF) sont considérées. Un autre logiciel maison procède ensuite au regroupement des ions par rapport à leur rapport m/z , charge et temps de rétention à l'intérieur de certaines tolérances pré-établies par l'utilisateur (habituellement ± 0.1 pour m/z et ± 1 minute pour tr). Une liste des ions peptidiques non redondants détectés parmi les replicatas d'analyse puce nano-HPLC-MS est obtenue.

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 L'évaluation de la capacité de charge

La capacité de charge de la puce nano-HPLC a été évaluée dans le contexte des analyses protéomiques en employant un mélange de digestats tryptiques de huit protéines, représentant une population des peptides ayant des masses moléculaires et des hydrophobicités très variés. Des quantités différentes de ce mélange (1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng et 1000 ng) ont été injectées en ordre croissant. La première puce nano-HPLC testée était une pré-colonne de 30 nL garnie d'une phase stationnaire Jupiter C_{18} avec des particules d'une taille de $4\mu m$ et une colonne chromatographique de 170 nL remplie d'une phase stationnaire Jupiter C_{18} avec des particules de $3\mu m$. Afin de déterminer la capacité de charge de cette configuration du système microfluidique, les intensités (hauteurs des pics) des différents ions peptidiques détectés ont été représentées

en fonction de la quantité injectée (figure 2.1). À titre d'exemple on a choisi huit ions peptidiques représentatifs détectés parmi la gamme de quantités injectées (1 – 1000 ng), couvrant une large gamme de valeurs de m/z , d'intensité et de temps de rétention.

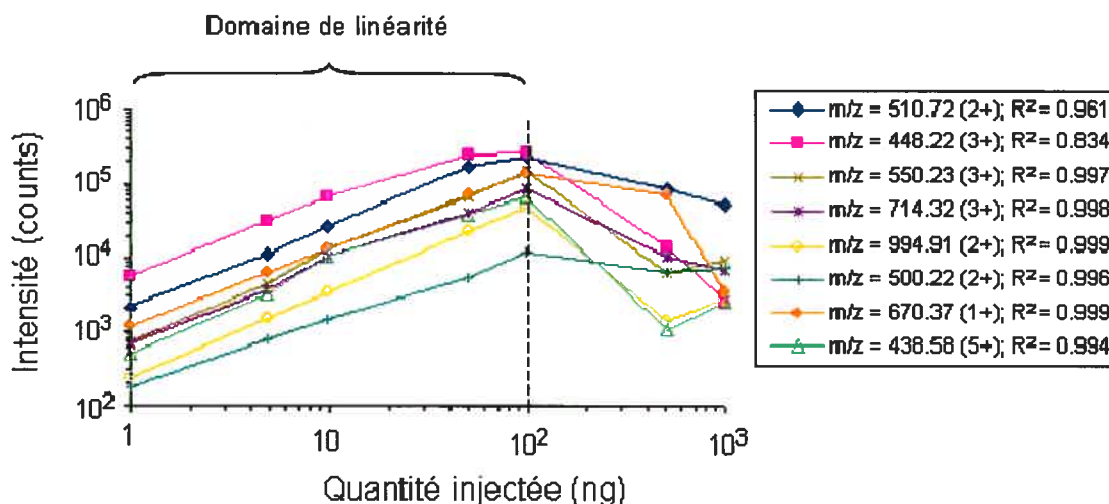


Figure 2.1 Variation de la réponse du spectromètre de masse pour différents ions peptidiques en fonction de la quantité totale de digestat trypsique injectée (1 – 1000 ng). Résultats obtenus sur une puce nano-HPLC garnie d'une phase stationnaire Jupiter C₁₈, 300 Å ayant des particules d'une taille de 4 µm dans la pré-colonne et d'une taille de 3 µm dans la colonne chromatographique. Les valeurs de coefficients de corrélation (R^2) sont calculées pour le domaine linéaire de 1 à 100 ng.

Une variation linéaire de l'intensité des ions a été observée sur plus de deux ordres de grandeur pour une quantité injectée allant jusqu'à 100 ng. La même tendance a été obtenue pour la capacité de charge lorsque l'aire des pics (à 10% de la hauteur) à travers de la gamme de quantités injectées a été considérée. Une fois que la quantité injectée excède le domaine de linéarité (la pré-colonne est saturée et tous les sites actifs sont occupés), nous avons observé un élargissement significatif des pics et en même temps qu'un déplacement graduel du temps de rétention des ions peptidiques à des temps beaucoup plus courts. L'augmentation de la quantité injectée n'a pas entraîné de variation significative des temps de rétention pour des injections de 1 – 100 ng.

À titre d'exemple, ces phénomènes sont illustrés, à la figure 2.2, pour un ion peptidique triplement chargé à m/z 501.59.

La figure 2.2a montre les chromatogrammes d'ion extrait superposés obtenus pour cet ion à travers la gamme de concentrations (de 1 ng à 1000 ng) injectées sur la puce nano-HPLC garnie de phase stationnaire Jupiter C₁₈.

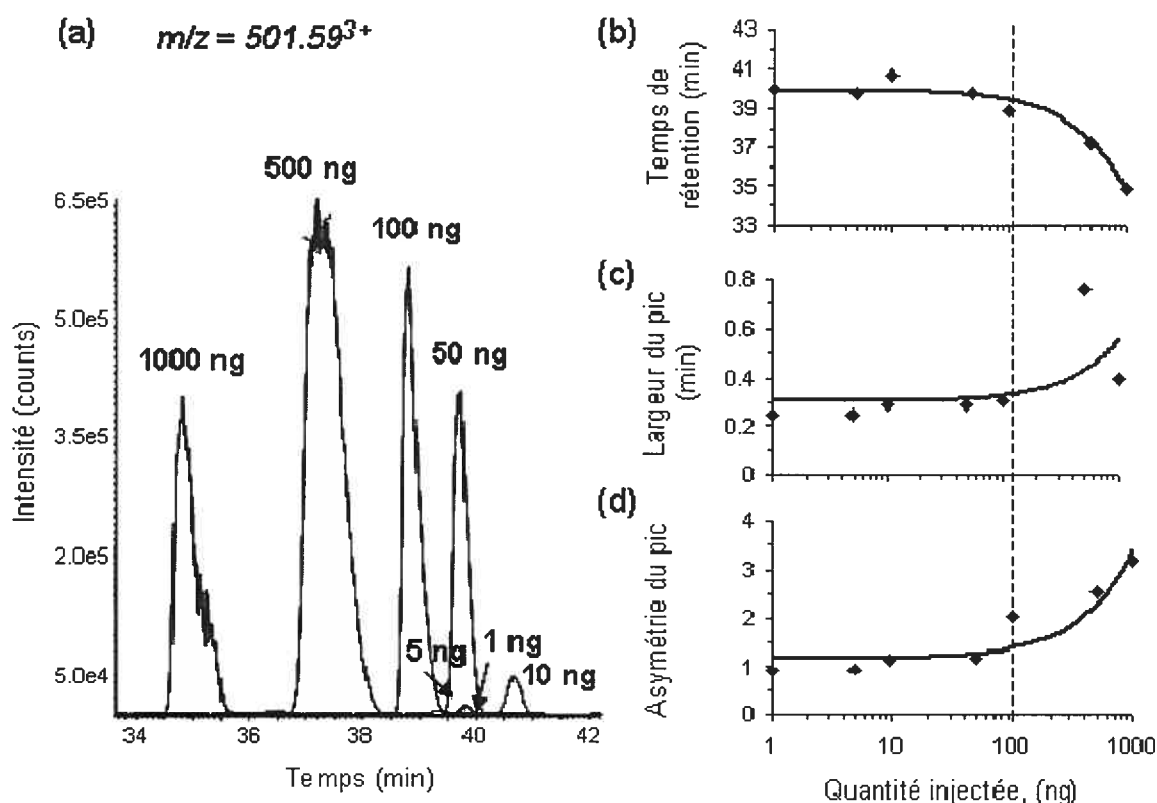


Figure 2.2 L'effet de la saturation de la pré-colonne (volume 30 nL) du système microfluidique sur l'ion peptidique triplement chargé de $m/z = 501.59$, a) Profils chromatographiques superposés pour des quantités de digestat trypsique de huit protéines injectée (1 – 1000 ng). b) Variation du temps de rétention selon la quantité injectée. c) Variation de la largeur du pic à mi-hauteur selon la quantité injectée. d) Variation de l'asymétrie du pic, calculé à 10% d'hauteur, pour différentes quantités injectées.

On peut observer l'évolution de la forme des pics avec l'augmentation de la quantité injectée. Dans le domaine linéaire, l'augmentation de la quantité injectée, n'occasionne qu'une faible variation du temps de rétention de l'ion peptidique (< 5%). Cependant, suite à la surcharge de la pré-colonne (> 100 ng injectées) le temps de rétention de l'ion peptidique diminue significativement avec une variation de plus de 5

minutes, correspondant à 14.4 % de changement, (figure 2.2b). Cette diminution des temps de rétention avec l'augmentation de la quantité injectée est expliquée en partie par un changement de sélectivité de la phase stationnaire grâce à une adsorption significative de peptides à la surface de la phase stationnaire qui change la nature des interactions avec les solutés. Par exemple, les sites hydrophobiques de la phase stationnaire C₁₈, étant recouvert par des peptides adsorbés confère maintenant un caractère plus hydrophile aux surfaces d'interactions. Ce recouvrement diminue la sélectivité de la phase stationnaire et par conséquent les temps de rétention des peptides séparés [68].

Lorsque la limite de charge est dépassée, on observe aussi que la largeur du pic augmente d'un facteur de 2.5 pour 500 ng injectés comparativement à la valeur moyenne de 0.28 min pour des quantités inférieures à 100 ng (figure 2.2c). On remarque également un élargissement significatif des pics ainsi qu'une asymétrie importante pour des quantités injectées de plus de 100 ng (figure 2.2c et 2.2d). En utilisant le même mélange de huit protéines digérées et la même gamme de quantités injectées (de 1 ng à 1000 ng), une valeur similaire de capacité de charge (100 ng), a été obtenue pour une puce nano-HPLC garnie de phase stationnaire Zorbax C₃ avec des particules d'une taille de 5 µm dans la pré-colonne (30 nL) et de phase stationnaire Zorbax C₁₈ avec des particules de 2.1 µm dans la colonne de séparation.

Le domaine de linéarité de la puce nano-HPLC munie d'une pré-colonne de 30 nL s'étend donc jusqu'à environ 100 ng de protéines. Il est important de noter qu'il est possible d'injecter des quantités plus grandes, cependant les performances chromatographiques seront compromises et l'analyse des digestats ne peut être que qualitatif. En augmentant le volume de la pré-colonne et donc sa capacité de charge, on s'attend à obtenir un domaine de linéarité plus étendu. Dans ce contexte, nous avons donc évalué la capacité de charge d'une puce nano-HPLC ayant la pré-colonne et la colonne de séparation garnies de phase stationnaire Zorbax C₁₈ avec des particules et des pores d'une taille de 5 µm et 300 Å respectivement, et un volume de la pré-colonne de 160 nL. À cette fin, des quantités différentes d'un mélange de digestats tryptiques de huit protéines (5 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 400 ng, 600 ng, 800 ng, 1000 ng, 3000 ng et 5000 ng) ont été injectées et les intensités des peptides ont été enregistrées à l'aide d'un

analyseur de masse oa-TOF (figure 2.3). À titre d'exemple, huit ions peptidiques représentatifs détectés parmi la gamme de quantités injectées (5 – 5000 ng) ont été choisis afin qu'ils couvrent une large gamme de valeurs m/z , des intensités et des temps de rétention.

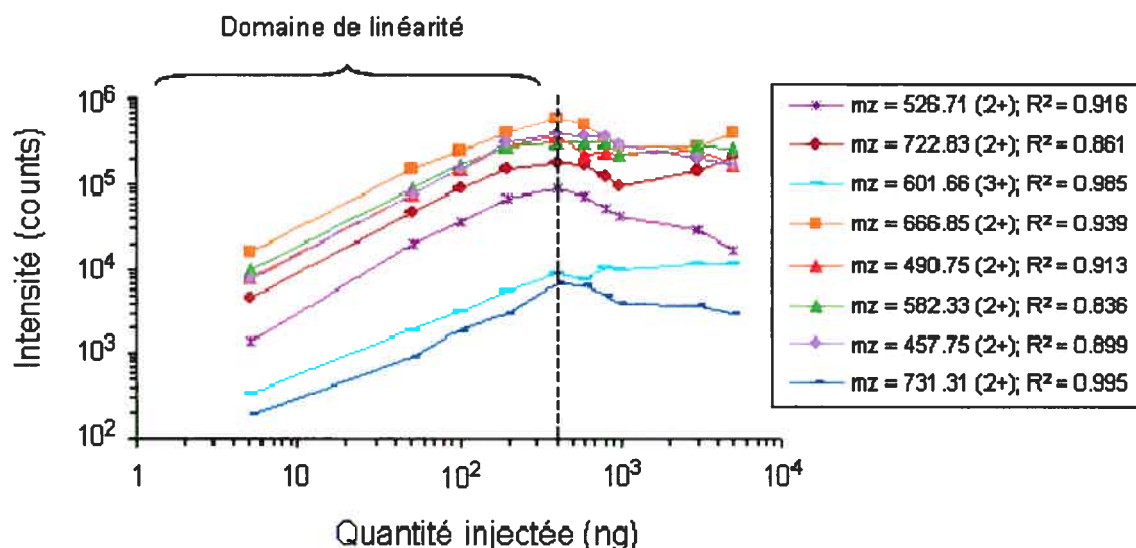


Figure 2.3 Variation de la réponse du spectromètre de masse pour différents ions peptidiques en fonction de la quantité injectée de digestat tryptique de huit protéines (5 – 5000 ng). Résultats obtenus sur une puce nano-HPLC ayant la pré-colonne et la colonne de séparation garnies de phase stationnaire Zorbax C_{18} avec des particules et des pores d'une taille de 5 μm et 300 Å respectivement, et un volume de la pré-colonne de 160 nL. Les valeurs de coefficients de corrélation (R^2) sont calculées pour le domaine linéaire de 5 à 400 ng.

La puce nano-HPLC munie d'une pré-colonne de 160 nL et d'une colonne analytique de 560 nL présente un domaine de linéarité allant jusqu'à environ 400 ng. Les mêmes phénomènes d'élargissement des pics et diminution des temps de rétention décrits pour le système ayant une pré-colonne de 30 nL sont observés lors de la surcharge de la pré-colonne. À titre d'exemple, ce phénomène est illustré pour un ion plus hydrophile ($m/z = 526.71$, figure 2.4a) et pour un ion plus hydrophobe ($m/z = 666.85$, figure 2.4b). Dans les deux cas, pour des quantités injectées plus élevées que 400

ng, on observe une diminution de la réponse accompagnée de l'élargissement des pics et la détérioration de leur forme.

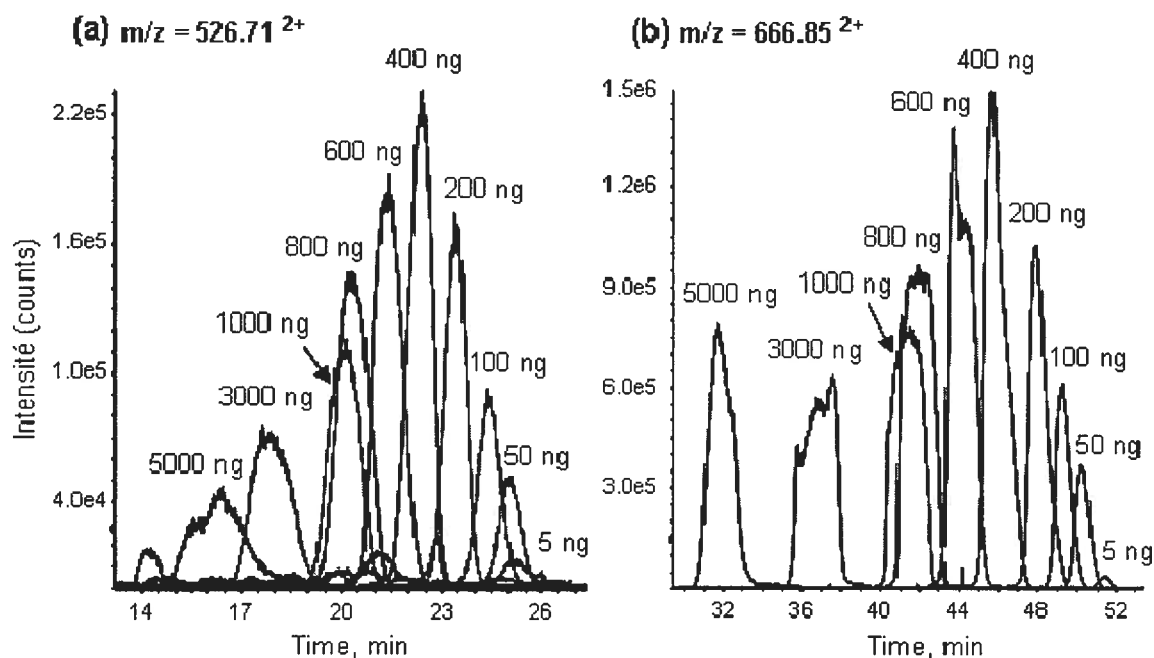


Figure 2.4 L'effet de la saturation du système microfluidique ayant une pré-colonne d'un volume de 160 nL. Profils chromatographiques superposés des ions doublement chargés de $m/z = 526.71$ (a) et $m/z = 666.85$ (b) à travers la gamme de quantités injectées de digestat tryptique des huit protéines (5 – 5000 ng).

Comme dans le cas de la puce nano-HPLC ayant une pré-colonne de 30 nL, une faible diminution des temps de rétention est observée à travers le domaine linéaire et un déplacement plus significatif de ceux-ci est noté suite à la surcharge de la pré-colonne. À titre d'exemple, ce phénomène est illustré à la figure 2.5a pour dix ions peptidiques représentatifs détectés parmi la gamme de quantités injectées (5 – 5000 ng) d'une telle façon pour qu'ils couvrent une large gamme de hydrophobicité et de valeurs m/z . La figure 2.5b montre la distribution du % de changement du temps de rétention des dix ions peptidiques pour la quantité maximale injectée (5000 ng) et pour la quantité correspondante à la limite de charge (400 ng). On observe que dans les deux cas, il y a la même tendance de diminution du % change du temps de rétention pour les ions plus hydrophobes (temps de rétention élevés) et que le % de diminution du temps de rétention est plus significatif quand la pré-colonne de la puce est saturée.

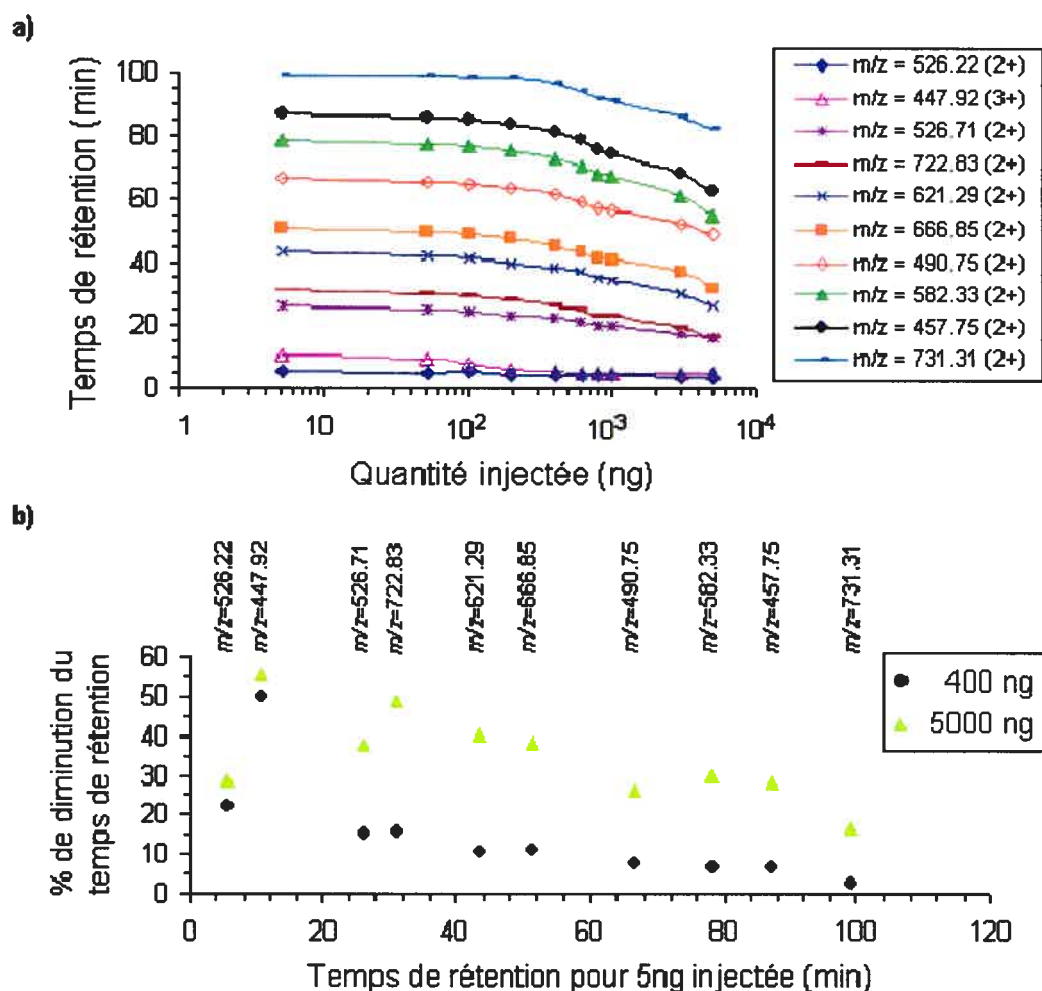


Figure 2.5 Variation du temps de rétention des différents ions peptidiques à travers la gamme de quantités injectées de digestat tryptique de huit protéines (5 – 5000 ng), (a); Distribution du % de changement (e.g., diminution) du temps de rétention pour l'injection de 400 ng et de 5000 ng respectivement en fonction du temps de rétention pour 5 ng injectées (b). Analyses effectuées sur une puce nano-HPLC garnie de phase stationnaire Zorbax C₁₈, 5 μ m et ayant une pré-colonne de 160 nL et une colonne chromatographique de 150 mm de longueur.

Ces résultats, obtenus pour la capacité de charge d'échantillon sur la puce nano-HPLC, nous ont permis de déterminer la gamme linéaire permettant de maintenir les performances analytiques du système microfluidique. Ainsi la borne supérieure de charge est de 100 ng pour une puce ayant une pré-colonne de 30 nL (les configurations

A1 et A2 du système microfluidique du tableau 2.1) et de 400 ng pour une pré-colonne de 160 nL (la configuration A3 du système microfluidique du tableau 2.1).

2.3.2 L'influence de la direction d'élution sur la séparation chromatographique

Le processus de séparation des échantillons protéomiques sur la puce nano-HPLC comprend deux étapes. D'abord l'échantillon est pré-concentré et dessalé sur une pré-colonne et ensuite il est séparé sur la colonne chromatographique. On distingue deux modes d'utilisation selon la direction d'élution des peptides² de la pré-colonne vers la colonne de séparation par rapport à la direction dans laquelle les peptides ont été chargés sur la pré-colonne. Le mode d'opération où la direction de chargement de l'échantillon sur la pré-colonne est la même que celle de sa désorption est appelé "Forward Flush Mode", (FFM). Le mode d'opération où l'élution des peptides est réalisée dans le sens contraire à celui du chargement est appelé "Backward Flush Mode", (BFM). La sélection du mode d'opération se fait avant l'analyse, en changeant la position du capillaire sur lequel est effectué le chargement de l'échantillon avec le capillaire de déchet de la micro valve. Initialement, le système microfluidique prototype puce nano-HPLC a été conçu pour être employé dans le mode FFM. Maintenant, les puces nano-HPLC fonctionnant avec l'interface chip-cube peuvent être employées dans les deux modes. Dans ce contexte, nous avons fait l'évaluation de l'influence de la direction d'élution de la pré-colonne sur les performances de séparation du système microfluidique en termes d'intensité du pic, de temps de rétention et de largeur du pic. À cette fin, en employant les deux modes d'élution (FFM et BFM) dans les mêmes conditions, nous avons injecté pour chaque mode, en triplicatas, 80 ng du mélange de huit protéines digérées (40 fmol/ μ L chaque protéine), sur une puce nano-HPLC ayant une pré-colonne de 40 nL et une colonne chromatographique de 170 nL. Les analyses de regroupement de peptides pour trois replicatas de chaque mode d'élution nous ont permis d'identifier les groupes des peptides³ individuels qui ont été détectés de façon

² *Peptide (ion peptidique)*: Ion défini par des coordonnées spécifiques (rapport m/z , temps de rétention, charge) sur la carte peptidique LC-MS.

³ *Groupe de peptides (groupe d'ions peptidiques, "peptide cluster")*: Regroupement d'ions peptidiques partageant les mêmes coordonnées spécifiques (à l'intérieur des tolérances définies) mais observé dans différentes injections ou conditions.

reproductible parmi les replicatas. Les tolérances utilisées lors du regroupement des ions de charges identiques ont été de ± 0.1 m/z et de ± 2 min de temps de rétention. Les groupes des peptides ainsi obtenus ont été utilisés pour analyser l'influence de la direction d'élution sur l'intensité du signal. La figure 2.6 montre la distribution des rapports entre la moyenne des intensités d'un peptide dans les trois replicatas effectués en FFM et la moyenne des intensités du même peptide dans les trois replicatas effectués en BFM, par rapport au temps de rétention.

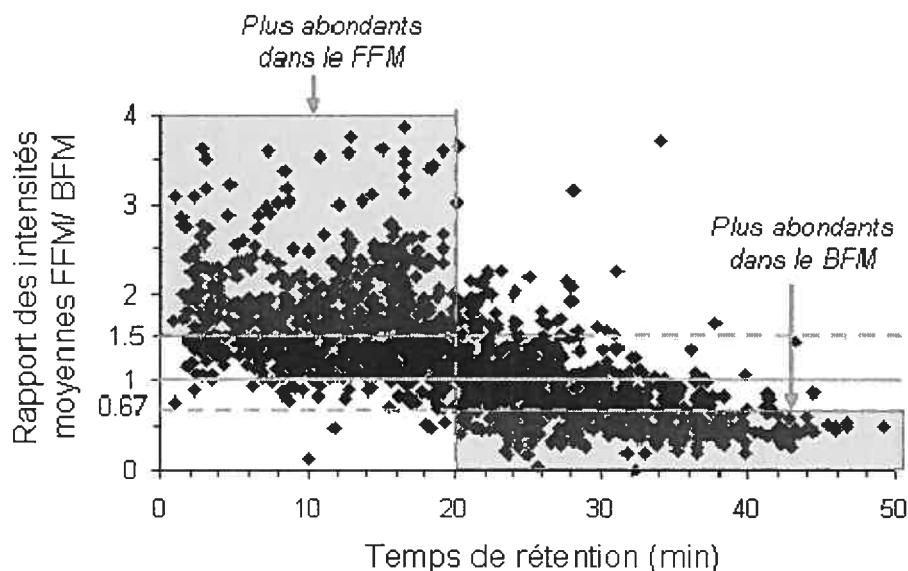


Figure 2.6 L'effet de la direction d'élution de la pré-colonne sur l'intensité des peptides. Résultats obtenus pour 1520 groupes de peptides détectés parmi toutes les injections (3 replicatas en FFM et 3 replicatas en BFM). Les analyses ont été effectuées sur une puce nano-HPLC garnie de phase stationnaire Zorbax C₁₈, 300Å, 5 µm et ayant une pré-colonne de 40 nL et une colonne chromatographique de 43 mm de longueur. Les lignes à 1.5 et à 0.67 (1/1.5) marquent les limites pour lesquelles les peptides sont au moins 1.5 fois plus intense en FFM ou en BFM respectivement.

Conformément à cette distribution, les peptides plus hydrophiles sont plus abondants en FFM alors que les peptides plus hydrophobes ont une réponse plus élevée en BFM. Par exemple, parmi les 1520 groupes de peptides détectés de façon reproductible, 28.2% de ceux-ci ont élués avant 20 min et était au moins 1.5 fois plus intense en FFM alors que 18.4% des peptides éluant après 20 min ont eu une réponse 1.5

fois plus élevée en BFM. De plus, le profil global de variation du rapport d'intensités pour 1520 groupes de peptides (figure 2.7) montre que 33% des peptides sont plus abondants d'un facteur 1.5 et 19.7% diminuent en intensité en FFM par rapport au BFM. Ce comportement peut être attribué aux phénomènes d'adsorption et désorption dans les pores de la phase stationnaire dont l'ouverture est orientée vers la direction de chargement d'échantillon sur la pré-colonne. La désorption des peptides qui ont été adsorbés dans des espaces contorsionnés des pores s'est montrée plus difficile en employant le transfert d'échantillon sur la colonne de séparation en sens contraire à celui de chargement à cause des problèmes d'accessibilité dans les pores. Les résultats obtenus montrent une perte significative de sensibilité pour les peptides hydrophiles dans le mode BFM.

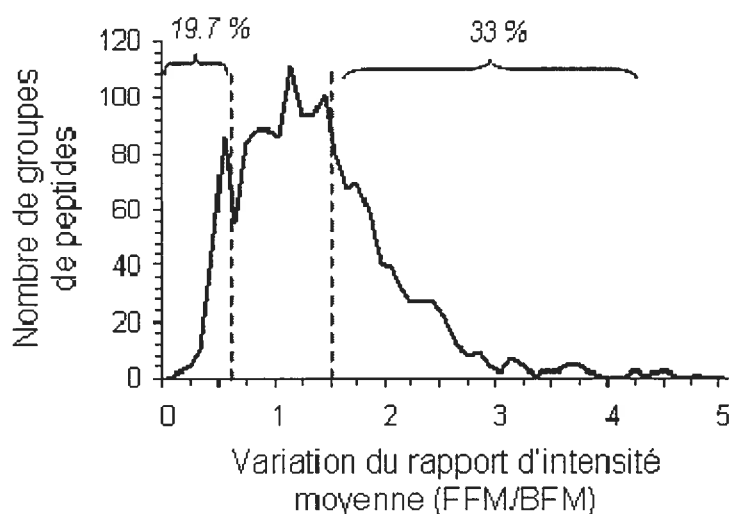


Figure 2.7 Profil de la variation du rapport entre la moyenne des intensités d'un peptide dans les trois replicatas effectués en FFM et la moyenne des intensités du même peptide dans les trois replicatas effectués en BFM. Les lignes à 1.5 et à 0.67 (1/1.5) marquent les limites pour lesquelles les peptides sont au moins 1.5 fois plus intense en FFM ou en BFM respectivement. Conditions identiques à celles de la figure 2.6.

L'influence de la direction d'élution sur le temps de rétention a été aussi analysée sur les 1520 groupes de peptides. La distribution de la différence entre la moyenne du temps de rétention des peptides en FFM et la moyenne du temps de

rétenion en BFM pour les trois replicatas est illustré à la figure 2.8. Cette figure indique que pour la majorité des peptides éluant entre 15 et 45 minutes aucune variation significative du temps de rétenion n'a été observée. Seuls les peptides éluant avant 15 minutes semblent éluer plus tôt dans le mode BFM par rapport à FFM. Par exemple, le profil de la fréquence des valeurs de la différence des temps de rétenion moyennes pour les 1520 groupes de peptides (insertion dans la figure 2.8) montre que le temps de rétenion a diminué avec une valeur médiane de 0.86 min (52 s) en employant le mode BFM par rapport au FFM. On observe aussi que pour plus de 90% des groupes de peptides, la diminution du temps de rétenion en BFM a varié entre 0.6 min (36 s) et 1.56 min (94 s).

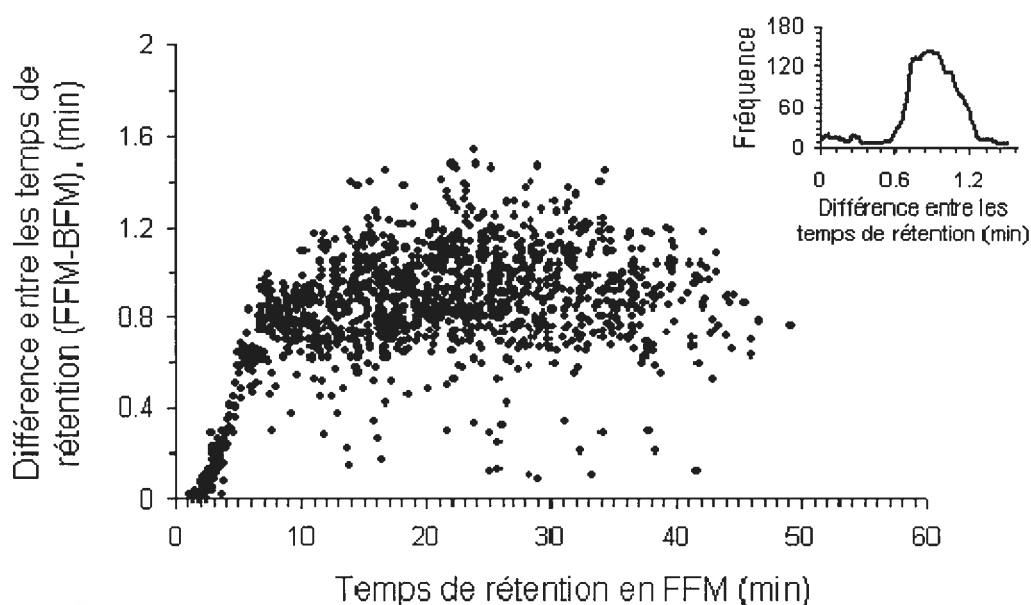


Figure 2.8 L'effet de la direction d'élution de la pré-colonne sur le temps de rétenion des peptides. Conditions identiques aux celles de la figure 2.6.

Une comparaison entre l'écart type relatif du temps de rétenion des trois replicatas pour chaque mode d'élution, basé sur les 1520 groupes de peptides détectés parmi les six injections est présentée à la figure 2.9. On obtient une meilleure reproductibilité en termes de temps de rétenion en BFM (avec un écart type relatif médian de 0.13%) par rapport à celle correspondante en FFM (avec un écart type relatif médian de 0.33%). Les analyses de reproductibilité des intensités des ions peptidiques

ont relevés que plus de 95% des 1520 ions peptidiques détectés de façon reproductible auraient une variation d'intensité inférieure à 20% en FFM et inférieure à 30% en BFM, et ce pour des intensités distribuées sur 3 ordres de grandeur.

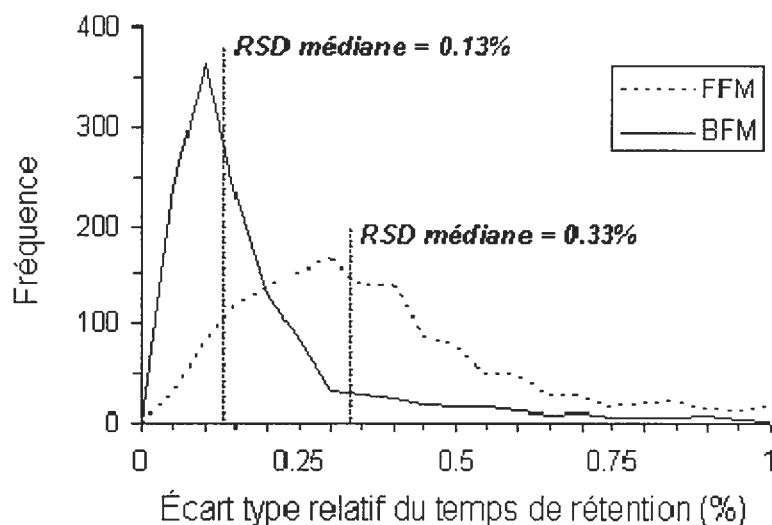


Figure 2.9 Comparaison entre la variation de l'écart type du temps de rétention pour les deux modes d'élution. Conditions identiques à celles de la figure 2.6.

Nous avons également évalué l'influence de la direction d'élution sur la largeur des pics. Les analyses ont été effectuées en utilisant les valeurs de la largeur des pics calculées à 50% et 10% de la hauteur respectivement, pour 581 groupes de peptides détectés de façon reproductible parmi les six injections (3 replicatas en FFM et 3 autres replicatas en BFM) et ayant une intensité plus grande que 10000 (figure 2.10).

Sur la figure 2.10 on voit que dans les deux modes, FFM et BFM, la largeur des pics à mi-hauteur a varié de 0.05 min à 1.2 min, avec une valeur médiane de 0.25 min en FFM et une valeur médiane de 0.24 min en BFM. En même temps, la largeur des pics à 10% de hauteur a varié de 0.1 min à 1.5 min avec des valeurs médianes de 0.53 min et de 0.53 min en FFM et en BFM respectivement. Ces résultats indiquent que dans notre cas, où la pré-colonne a des dimensions miniaturisées, il n'y a pas une influence significative de la direction d'élution sur la largeur des pics. Une diminution d'environ seulement 5% à mi-hauteur est observée dans le mode BFM.

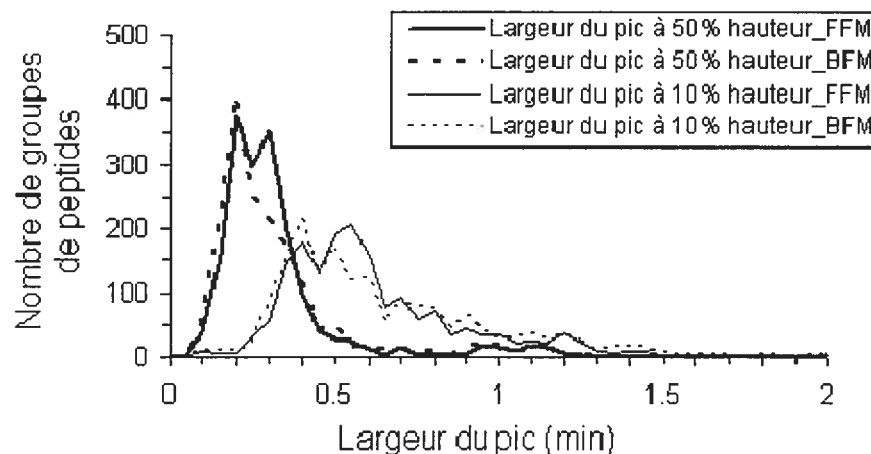


Figure 2.10 Effet de la direction d'élution de la pré-colonne sur la largeur des pics. Données obtenues pour 581 groupes d'ions peptidiques ayant une intensité plus grande que 10000 et détectés de façon reproductible dans les trois replicatas en FFM et les trois replicatas en BFM. Les analyses ont été effectuées sur une puce nano-HPLC garnie de phase stationnaire Zorbax C₁₈, 300Å, 5 µm et ayant une pré-colonne de 40 nL et une colonne chromatographique de 43 mm longueur.

Compte tenu de ces résultats, on peut conclure que lors de l'analyse des mélanges complexes protéomiques, la direction d'élution par rapport à celle de chargement a seulement une influence significative sur l'intensité des ions peptidiques et principalement pour les peptides hydrophiles, lesquels étant moins bien retenus en mode BFM.

2.3.3 L'influence de la température sur la séparation chromatographique

Un autre paramètre auquel nous sommes intéressés du point de vue de la performance de séparation chromatographique sur la puce nano-HPLC est la température. À cette fin, l'interface prototype Rev 3 du système microfluidique a été modifiée afin de permettre le chauffage de la puce nano-HPLC aux températures désirées pendant l'analyse. La température pré établie a été contrôlée et maintenue constante en utilisant un "Microprocessor-Based Temperature/Process Controller" (Omega, USA). Des analyses préliminaires ont été faite à quatre températures différentes (20 °C, 40 °C, 50 °C et 60 °C) en injectant successivement sur une puce nano-HPLC, à

chacune des températures, des quantités croissantes (de 5 ng à 500 ng) d'un mélange de huit protéines digérées par la trypsine. Le système microfluidique comprenant une phase stationnaire Jupiter C 18 ayant des particules d'une taille de 4 μm dans la pré-colonne (30 nL) et de 3 μm dans la colonne chromatographique (45 x 0.075 x 0.05 mm). En utilisant les cartes peptidiques obtenues pour chaque concentration et chaque température, des analyses de regroupement de peptides ont été effectuées. La liste des peptides détectés de façon reproductible parmi les différentes injections a été utilisée pour déterminer l'influence de la température sur l'intensité, sur le temps de rétention et sur la largeur des pics. La figure 2.11 montre la variation de l'intensité en fonction de la température. Seulement une très légère amélioration de la sensibilité a été observée pour les ions peptidiques de faible abondance, alors qu'une légère diminution a été observée pour les ions plus intenses (figure 2.11a). Une comparaison globale entre la distribution de 847 ions peptidiques en fonction de leur intensité, a révélé que le nombre d'ions ayant une intensité plus basse ou égale à 2000 counts (279 ions à 20°C), a augmenté de 2.5% à 40 °C, de 25.8% à 50 °C et de 28.3% à 60 °C (figure 2.11b). Un comportement similaire a été observé pour toutes les autres quantités injectées. En outre, on a observé que les ions peptidiques plus hydrophiles ont manifestés une augmentation de l'intensité avec la température. Par contre, l'intensité des ions hydrophobes diminue lorsque la température augmente. À titre d'exemple, ces phénomènes sont illustrés pour un ion plus hydrophile (temps de rétention 8.0 minutes) à la figure 2.11c et pour un ion hydrophobe (temps de rétention 18.8 minutes) à la figure 2.11d. L'augmentation de la température de la phase mobile permet un préchauffage de l'éluant, un avantage permettant d'accroître l'évaporation rapide des solutés lors de l'ionisation par nébulisation électrostatique. Par contre, nous n'avons pas observé d'effet global au niveau de la sensibilité lors de l'augmentation de la température de la puce. D'autre part un réchauffement de la pré-colonne durant le processus de chargement d'échantillon diminue la capacité de charge de la puce nano-HPLC. Il est possible que l'augmentation de la sensibilité anticipée lors du préchauffage de l'éluant soit contre balancée par la diminution de la capacité de charge de telle sorte qu'aucun effet significatif ne soit observé lors de ces expériences.

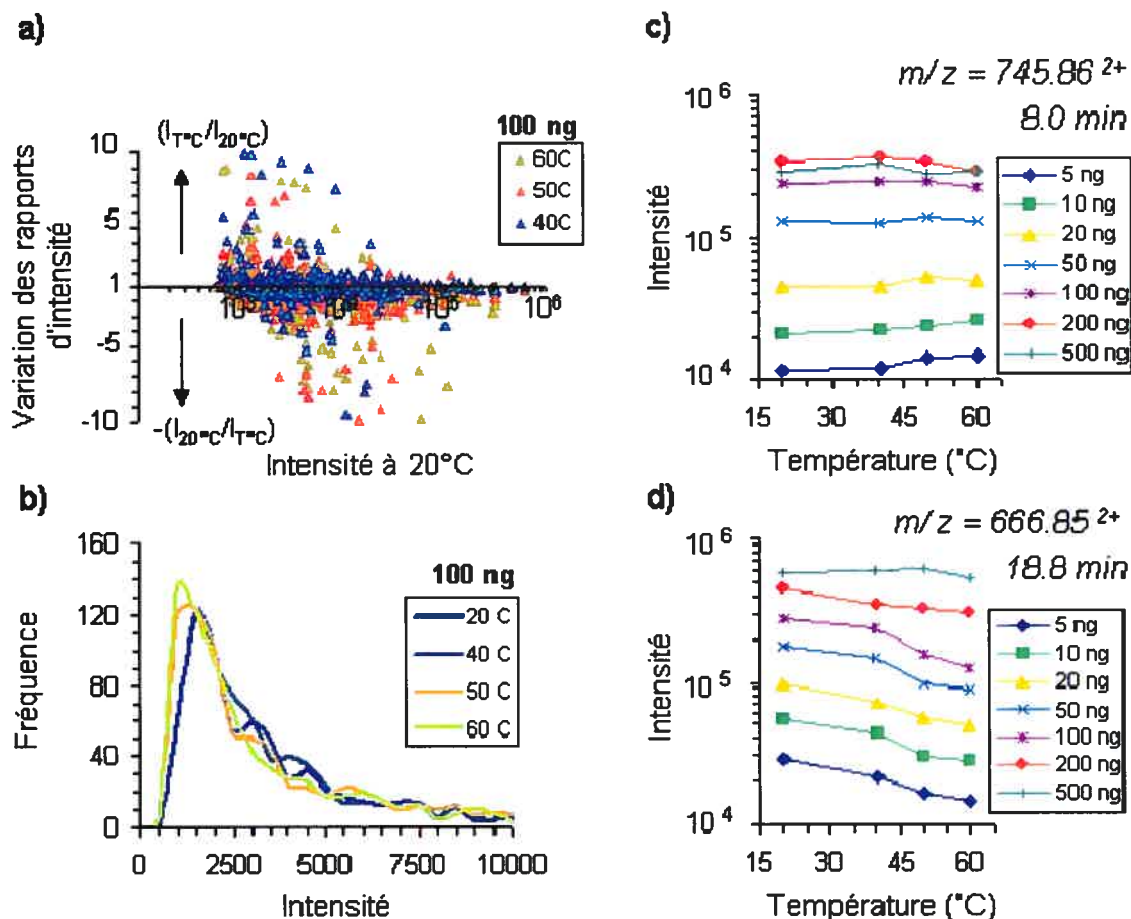


Figure 2.11 L'influence de la température sur l'intensité. a) Variation des rapports d'intensité ($I_{T^{\circ}\text{C}}/I_{20^{\circ}\text{C}}$) pour les trois températures plus élevées (40°C , 50°C et 60°C) par rapport à l'intensité correspondante à 20°C ($I_{20^{\circ}\text{C}}$), pour 847 ions détectés de façon reproductible à travers la gamme de températures; b) Distribution des ions peptidiques en fonction de leur intensité pour chaque température, dans des conditions identiques aux celles du point a); c) Variation de l'intensité d'un ion hydrophile doublement chargé, $m/z = 745.86$, en fonction de la température à travers la gamme de quantités injectées; d) Variation de l'intensité d'un ion hydrophobe doublement chargé, $m/z = 666.85$, en fonction de la température à travers la gamme de quantités injectées.

Par contre, les analyses de regroupement de peptides à travers la gamme de températures ont montré que les temps de rétention pour plus de 85% des peptides détectés de façon reproductible, ont diminué progressivement à mesure que la

température augmente de 20 °C à 60 °C (figure 2.12a). Les valeurs médianes pour la différence des temps de rétention ont été de 0.78 min à 40 °C, 1.43 min à 50 °C et 2.16 min à 60 °C. Des comportements similaires ont été observé pour toutes les quantités injectées et les résultats obtenus sont en accord avec les données de la littérature [105, 106]. Nous avons ensuite regardé la variation de cette différence de temps de rétention à travers la gamme de quantités injectées sur la puce nano-HPLC. La figure 2.12b montre que la différence entre le temps de rétention à 20 °C et le temps de rétention à une température plus élevée, diminue à mesure que la quantité injectée sur le système augmente. La même tendance a été observée pour les trois températures, (40 °C, 50 °C et 60 °C). Ce comportement est probablement expliqué par un changement de l'isotherme d'adsorption avec l'augmentation de température.

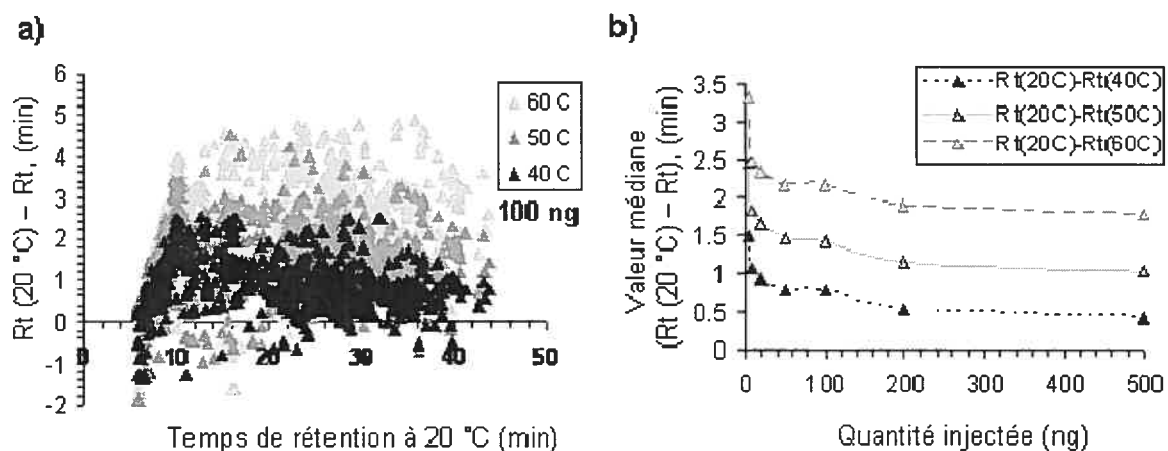


Figure 2.12 L'influence de la température sur le temps de rétention. a) Distribution de la différence entre le temps de rétention à 20 °C et le temps de rétention à une température plus élevée (40 °C, 50 °C et 60 °C). Résultats obtenus pour 847 des ions détectés de façon reproductible à travers la gamme de températures, pour 100 ng injectés sur la puce nano-HPLC; b) Variation de la différence entre le temps de rétention à 20 °C et le temps de rétention à une température plus élevée (40 °C, 50 °C et 60 °C) par rapport à la quantité injectée.

L'influence de la température sur la largeur des pics a été analysée avec la même série de cartes peptidiques et de listes de groupes des peptides. Aucun effet global significatif n'a été révélé suite à l'augmentation de la température. Une réduction de la

largeur des pics a été observée pour des peptides éluant très tôt alors qu'une augmentation de la largeur a été observée pour les peptides hydrophobes.

La température joue un rôle important en HPLC comme variable de sélectivité [105-107]. À partir des cartes peptidiques nous avons observé un changement en sélectivité avec la température pour toutes les quantités injectées. Une carte peptidique contient tous les ions peptidiques identifiés selon une échelle tridimensionnelle, représentant le rapport m/z (abscisse), le temps de rétention (ordonnée) et l'intensité selon une échelle logarithmique de couleurs. L'échelle de couleur varie du brun au jaune, le jaune indiquant une intensité plus élevée. La charge de chaque ion peptidique est identifiée par un symbole (le cercle, la croix, le triangle et le carré représentent respectivement les ions simplement, doublement, triplement et quadruplement chargés). À titre d'exemple, la figure 2.13 montre le changement en sélectivité suite à l'influence de la température, pour l'analyse de 50 ng de mélange de huit protéines digérées. Des régions agrandies des cartes peptidiques aux quatre températures (20 °C, 40 °C, 50 °C et 60 °C) mettent en évidence l'inversion de l'ordre d'élution pour l'ion doublement chargé m/z 620.83 par rapport à l'ion doublement chargé m/z 619.75 et à l'ion triplement chargé m/z 621.92 à travers la gamme de températures. Vers 50 °C les ions 620.83²⁺ et 619.75²⁺ co-éluent (figure 2.13c). Une autre inversion de l'ordre d'élution a eu lieu dans ces régions des cartes peptidiques, entre l'ion doublement chargé m/z 617.26 et l'ion quadruplement chargé m/z 617.6 pour cette gamme de température. Les résultats préliminaires obtenus ne montrent pas de tendances bien définies en ce qui est de la sensibilité, la capacité de charge et la largeur de pics. Ils concordent cependant bien avec les données de la littérature pour le temps de rétention et pour la sélectivité. Toutes les analyses pour l'évaluation de l'effet de la température, ont été effectuées en chauffant toute la surface de la puce nano-HPLC, c'est-à-dire la pré-colonne et la colonne chromatographique dans le même temps. Puisque la majorité des études sur l'influence de la température en HPLC ont visé seulement le chauffage de la colonne de séparation, il serait donc intéressant d'analyser de façon individuelle l'influence de la température sur les processus de chargement d'échantillon et de séparation peptidique.

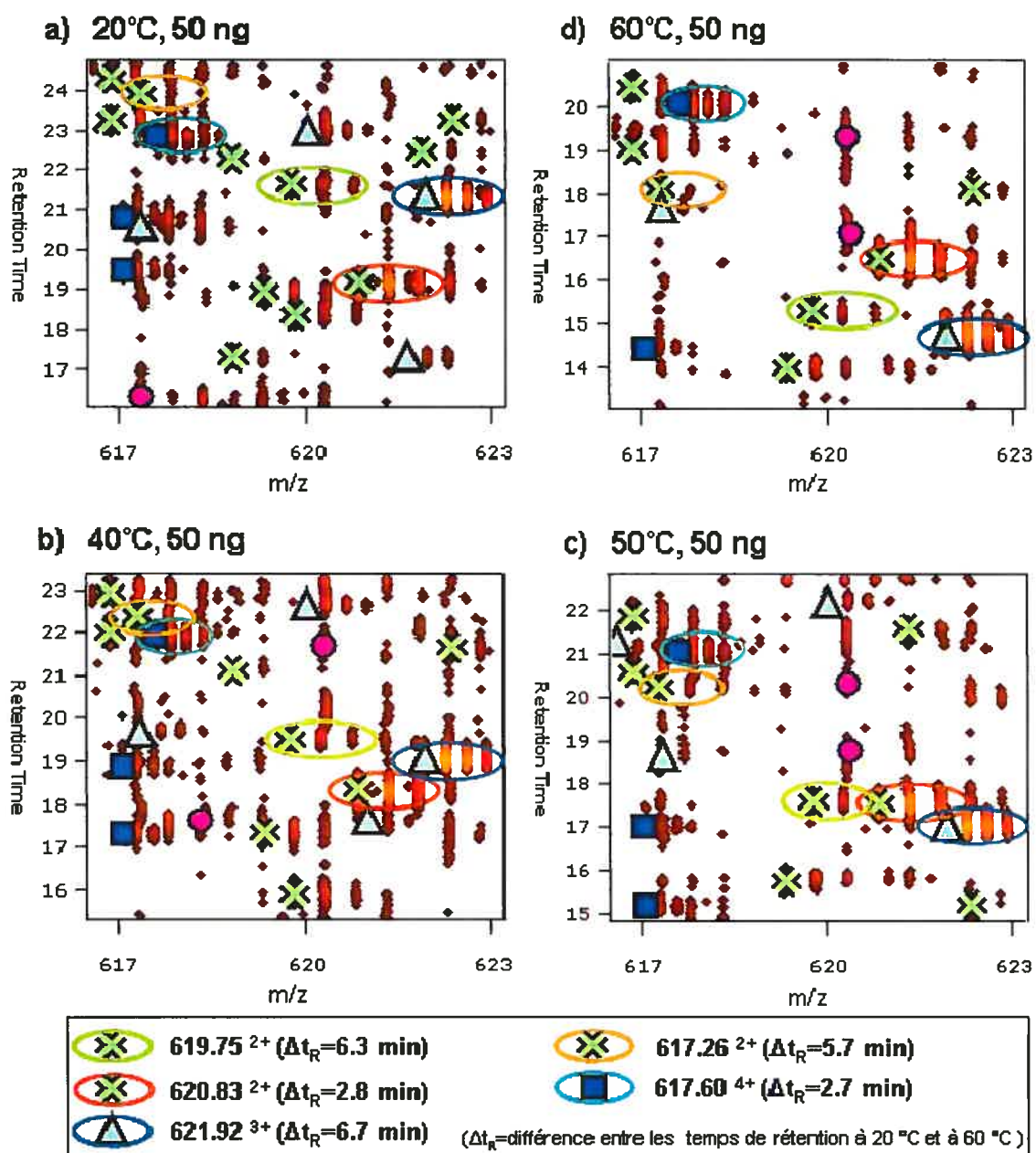


Figure 2.13 L'effet de la température sur la sélectivité pour une région de la carte peptidique; injection de 50 ng sur une puce nano-HPLC garnie de phase stationnaire Jupiter C₁₈, 300Å, avec des particules de 4 µm dans la pré-colonne (30 nL) et de 3 µm dans la colonne chromatographique de 43 mm longueur. a) 20 °C; b) 40 °C; c) 50 °C; d) 60 °C.

De cette façon, il faudrait réaliser une interface qui peut permettre de réduire la température de la pré-colonne pendant le processus de chargement d'échantillon pour

favoriser l'adsorption des peptides et ensuite chauffer la colonne chromatographique, indépendamment de la pré-colonne, pour améliorer la séparation des peptides.

2.4 Conclusion

Les analyses effectuées sur les puces nano-HPLC ont donc permis de déterminer la capacité de charge optimale de ces systèmes dans le contexte protéomique, pour des mélanges complexes de peptides. Ceci nous permet de connaître la gamme des quantités qu'on peut injecter sur la puce nano-HPLC et pour lesquelles le spectromètre de masse donne une réponse linéaire. Pour une puce nano-HPLC ayant une pré-colonne de 30 nL et une colonne chromatographique de 170 nL, un élargissement des pics, une diminution significative du temps de rétention et une détérioration de l'asymétrie des pics ont été observés au-delà de 100 ng injectés. Un déplacement non significatif des temps de rétention a été aussi observé à travers la gamme linéaire. Cette diminution des temps de rétention avec l'augmentation de la quantité injectée est expliquée en partie par un changement de sélectivité de la phase stationnaire, grâce à une adsorption significative de peptides à la surface de la phase stationnaire change la nature des interactions avec les solutés. Ces phénomènes ont été aussi accompagnés par une diminution du signal du spectromètre de masse.

Une amélioration du domaine de linéarité a été obtenue en augmentant le volume de la pré-colonne de la puce nano-HPLC. De cette façon, pour une puce nano-HPLC ayant une pré-colonne de 160 nL et une colonne analytique de 560 nL, ce domaine a été étendu jusqu'à 400 ng et le phénomène d'élargissement des pics et leur déplacement significatif vers des temps de rétention plus bas aussi a été observé dans la zone de surcharge. Il est à noter qu'on peut injecter plus que la capacité de charge du système microfluidique mais ceci aura des conséquences défavorables sur les performances chromatographiques et l'adsorption non sélective. Outre l'augmentation du volume de la pré-colonne, une autre façon d'améliorer la gamme linéaire du système microfluidique, est d'employer des séparations multi dimensionnelles. Ces dernières permettent de simplifier la complexité d'échantillon en le divisant en plus petites portions. Cette approche sera évaluée au quatrième chapitre du présent mémoire.

La puce nano-HPLC permet d'éluer les peptides de la pré-colonne sur la colonne chromatographique en deux modes, en FFM ou en BFM. La comparaison des deux types d'élution a montré que le paramètre le plus affecté par la direction d'élution est l'intensité des peptides, et ce principalement pour les peptides hydrophiles. Des mesures de pics pour plus de 1500 groupes de peptides détectés de façon reproductible, ont indiqués que 28.2% des peptides qui ont élués avant 20 min ont eu une intensité plus élevée en mode FFM et 18.4% des peptides qui ont élués après 20 min ont eu une réponse plus élevées en mode BFM. Aussi, en mode BFM a été observé une diminution des temps de rétention jusqu'à 94 s et une diminution insignifiante (5%) de la largeur des pics à mi-hauteur, de 0.247 min en mode FFM à 0.235 min en mode BFM. Donc, globalement, pour la configuration du système microfluidique utilisée dans cette étude (section B dans le tableau 2.1) le mode FFM est recommandé pour l'élution de la pré-colonne. De plus, pour les composés hydrophiles (comme les phosphopeptides) éluant à des temps de rétention courts, le mode FFM présente un avantage marqué en terme de gain d'intensité comparativement au mode BFM.

Suite aux résultats préliminaires, aucun effet global significatif en termes d'intensité et de largeur de pic n'a été révélé à mesure que la température du système a été augmentée. Par contre, les analyses de regroupement de peptides pour 847 ions détectés de façon reproductible à travers la gamme de température ont montré que les temps de rétention pour plus de 85% des peptides, ont diminué progressivement à mesure que la température a augmenté de 20 °C à 60 °C. Un changement de sélectivité pour la gamme de température, allant jusqu'à l'inversion de l'ordre d'élutions a été observé pour certains peptides. Afin de mieux comprendre l'influence de la température sur les performances chromatographique du système microfluidique, une étude similaire portant aussi sur des mélanges complexes des peptides pourrait se faire en modifiant la température de la pré-colonne et de la colonne de séparation de façon indépendante. Étant donné qu'aucune amélioration significative en termes de sensibilité n'a été observée suite à l'augmentation de la température du système microfluidique, on recommande d'effectuer les analyses LC-MS sur la puce nano-HPLC à la température de la pièce (20°C).

**3. Integrated microfluidic devices with enhanced
separation performance:
Application to phosphoproteome analyses of
differentiated cell model systems⁴**

Mihaela Ghitun, Eric Bonneil, Marie-Hélène Fortier, Hongfeng Yin, Kevin Killeen,
Pierre Thibault, *Journal of Separation Science*, 2006, 29, 1539-1549.

⁴ Les références de ce chapitre se retrouvent à la section 7

Abstract

This work reports on the application of a microfluidic device integrating nanoscale LC to nanoelectrospray MS (nano-LC-chip-MS) for the analysis of complex protein digests. Peak profile analyses of more than 700 peptide ions, reproducibly detected across replicate nano-LC-chip-MS runs ($n = 5$), indicated that the system provided RSD values of 0.24% on retention time, ± 30 ppm on m/z measurement and $\pm 30\%$ variation on intensity over three orders of magnitude. RP adsorbant media with different alkyl chains and particle size packed in both trapping and separation channels were investigated to improve the chromatographic performance of this system. A two-fold improvement in chromatographic peak capacity was achieved using microfluidic devices comprising a $5\text{ }\mu\text{m}$ -particle C_3 -phase trap with $2.1\text{ }\mu\text{m}$ -particle C_{18} -phase separation channel compared to the traditional $5\text{ }\mu\text{m}$ -particle C_{18} -stationary phase. Enhanced sample selectivity for the identification of phosphopeptides was obtained by combining immobilized metal affinity media prior to peptide separation on the RP microfluidic device. This system was evaluated in the context of differential phosphoproteome analyses to identify changes in signaling events and protein expression of human monocytes following the administration of phorbol ester.

3.1 Introduction

The coupling of microfluidics devices to mass spectrometry is relatively recent, and early reports of this sample introduction system for nanoelectrospray mass spectrometry (nES-MS) were described for electrophoresis-based separation using liquid junction and sheathless interfaces [4, 5, 17, 34, 37]. The coupling of microfluidics devices to matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) has also been reported using off-line deposition techniques [21, 108]. Low femtomole mass spectrometry detection of peptides is commonly achieved using electrophoresis-based separation. However, the concentration detection limits have been limited to μM range due to sample injection volumes requirements (pL-nL) necessary to maintain satisfactory peak widths and resolution. Further improvements in detection limits, were achieved using sample stacking [17] and preconcentration via reversed phase adsorbant [6, 18] thus enabling low nM detection of peptide standards.

More recently, reversed phase-mediated separations were implemented in a microfluidics format through derivatization of microchip wall [109] or by photo-induced polymerization of monolithic materials [110]. In an effort to increase the versatility of microfluidic devices and to combine advantages imparted by adsorbant-based separation we introduced an integrated chip design tailored for high sensitivity proteomic analyses [43, 44]. This microfluidic device integrates laser-ablated channels for desalting and analytical separation packed with C_{18} -reversed phase adsorbant and is terminated by a nanoelectrospray tip. This device is maintained on a high pressure manifold consisting of a switching valve enabling the automation of sample loading/desalting and separation functions. The chip device utilizes a nanoLC pump identical to that used for capillary LC separations. In addition to providing comparable separation performances to capillary columns of 150 μm i.d. size, the integration of pre-column, analytical column and nanoelectrospray into a device smaller than a credit card greatly facilitates the operation of nanoLC-MS analyses.

In the present investigation, we evaluated microfluidic devices packed with reversed-phase media of different particle size (5, 3.5 and 2.1 μm) and hydrophobicity (C_3 , C_{18}) to improve the separation performance of the present system. Earlier reports

indicated that the use of smaller particles and higher pressure can significantly reduce the distance over which analyte diffusion takes place and hence can provide a corresponding reduction in plate height [111, 112].

The capability of the present microfluidic device to detect and identify changes in protein expression was investigated as part of a study on phosphorylation events following chemical stimulation of human monocyte cells with phorbol ester. Protein phosphorylation is a necessary requirement for modulating biological processes such as signaling, differentiation and growth [113-115]. In this context, we investigated early changes in the phosphoproteome of U937 cells following incubation with phorbol ester [116-118].

3.2 Materials and methods

3.2.1 Materials

HPLC grade water and acetonitrile were purchased from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). Formic acid (FA), ammonium acetate and ammonium bicarbonate were obtained from EM Science (Mississauga, ON, Canada). Monocytic U937 and J774 cells were purchased from ATCC (Manassas, VA). Dimethyl sulfoxide (DMSO), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), α -casein and acetic acid were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Reduced and iodoacetamide alkylated protein digests (bovine serum albumin, rabbit aldolase, yeast alcohol dehydrogenase, bovine catalase, bovine glyceraldehyde 3P dehydrogenase, *E. coli* glycerokinase, human lactotransferrin, bovine lactoperoxidase) were purchased from Michrom Bioresources (Auburn, CA). The Zorbax C₃-5 μ m i.d. particles and C₁₈-2.1, 3.5 and 5.0 μ m i.d. particles were obtained from Agilent (Santa Clara, CA).

3.2.2 Sample preparation

A standard solution of 8 protein digests (40 fmol/ μ L each) in a H₂O/5% acetonitrile (0.2% formic acid) solution was prepared by mixing the individual digests. The J774 cells were cultured as described previously [119]. The U937 cells were grown

in 10 % FBS (Hyclone, Logan, Utah) supplemented RPMI-1640 with glutamine and pen/strep (penicillin/ streptomycin) (Hyclone) to a density of 2 million cells/mL in 100 ml of culture medium. Half of the culture was exposed for 60 min to PMA (final concentration of 150 nM) before harvesting. Cells were resuspended in 10 mM Tris (EMD Biosciences, Gibbstown, NJ), 2mM MgCl₂ (Sigma, St Louis, MO), 3 mM CaCl₂ (Sigma), sucrose 500 mM (Sigma). Cell lysis was performed using a metal douncer homogeniser. Proteins were precipitated with acetone. Total protein amount was quantitated by BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL). Proteins were digested in 1 M urea, 50 mM ammonium carbonate with Lys-C (Wako Chemicals, Richmond, VA) for 4 hrs at 37 °C and then with Promega trypsin (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) overnight at 37 °C. Samples were evaporated to dryness. A tryptic digest of the phosphoprotein α -casein was spiked at various concentrations in a J774 protein digest sample reconstituted in 5% acetic acid. Phosphopeptide enrichment of spiked J774, PMA-treated and untreated U937 samples was performed with Ga(III)-IMAC column from Pierce (Rockford, IL). Samples were incubated for 20 min on the columns and then washed three times with 0.1% acetic acid, three times with 30% acetonitrile (0.07% acetic acid). The phosphopeptides were eluted with 0.1% ammonium acetate pH 9.6, dried on a speedvac and reconstituted in 5 % acetonitrile (0.2% formic acid).

3.2.3 Nano LC-chip-MS analyses

The microfluidic devices custom made all comprised laser-ablated channels (enrichment/trap prechannel of 30 nL, LC separation channel of 45 x 0.075 x 0.050 mm) packed with different separation media and connected to a nano-electrospray tip (Figure 1). All analyses were performed using a nanoLC1100 system coupled to a TOF or an ion trap XCT mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A linear gradient elution of 8-60 % acetonitrile (0.2 % formic acid) in 60 minutes was used for all separations.

3.2.4 Database searching with mass spectrometry data

Data base searches were performed against a non-redundant National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using Mascot (Matrix Science, London, UK) and narrowing the search criteria to human and/or rodent species. Parent ion and fragment ion mass tolerances were both set at ± 0.4 Da.

3.2.5 Peptide detection and clustering

Raw data files (*.wiff) generated from the TOF acquisition software were read and processed using an in-house peptide detection software to identify all ions according to their corresponding m/z values, retention time, peak widths, intensity and charge state. Intensity values above a user-defined intensity threshold above the background noise (typically 300 counts) were considered. A list of unique peptide ions (peptide cluster) found across relevant replicates of nanoLC-chip-MS analyses was obtained by clustering ions based on their respective charge, m/z and time within user-specified tolerances (typically ± 0.1 m/z and ± 1.0 min). Segmentation analyses were also performed across sample sets from different cell growth conditions (e.g. control and challenge) by comparing the intensities of peptide clusters to identify those showing reproducible and statistically meaningful changes in abundance [43].

3.3 Results and discussion

As part of the present investigation, we evaluated the analytical performances of a nanoLC-chip system to determine figures of merit characterizing its reproducibility in terms of m/z , retention time and intensity measurements. A schematic description of the microfluidic device is shown in Figure 3.1. This nanoLC chip integrates a 30 nL volume precolumn, a 4.5 cm length analytical column with a $75 \times 50 \mu\text{m}$ cross section channel and a $10 \mu\text{m}$ i.d. nanoelectrospray emitter. The chip is positioned on a support plate housing a valve rotor by three aligning pins. On-line filter ($0.5 \mu\text{m}$ pore size) is positioned between the valve stator and the chip to remove any particulate matter that

could clog the small channels. The chip is mounted in a clamping mechanism enabling proper alignment and sealing of the chip within the manifold. An adjustable two-way translation stage allows the positioning of the device in front of the mass spectrometer while the nanoelectrospray emitter can be viewed through a camera and lighting system.

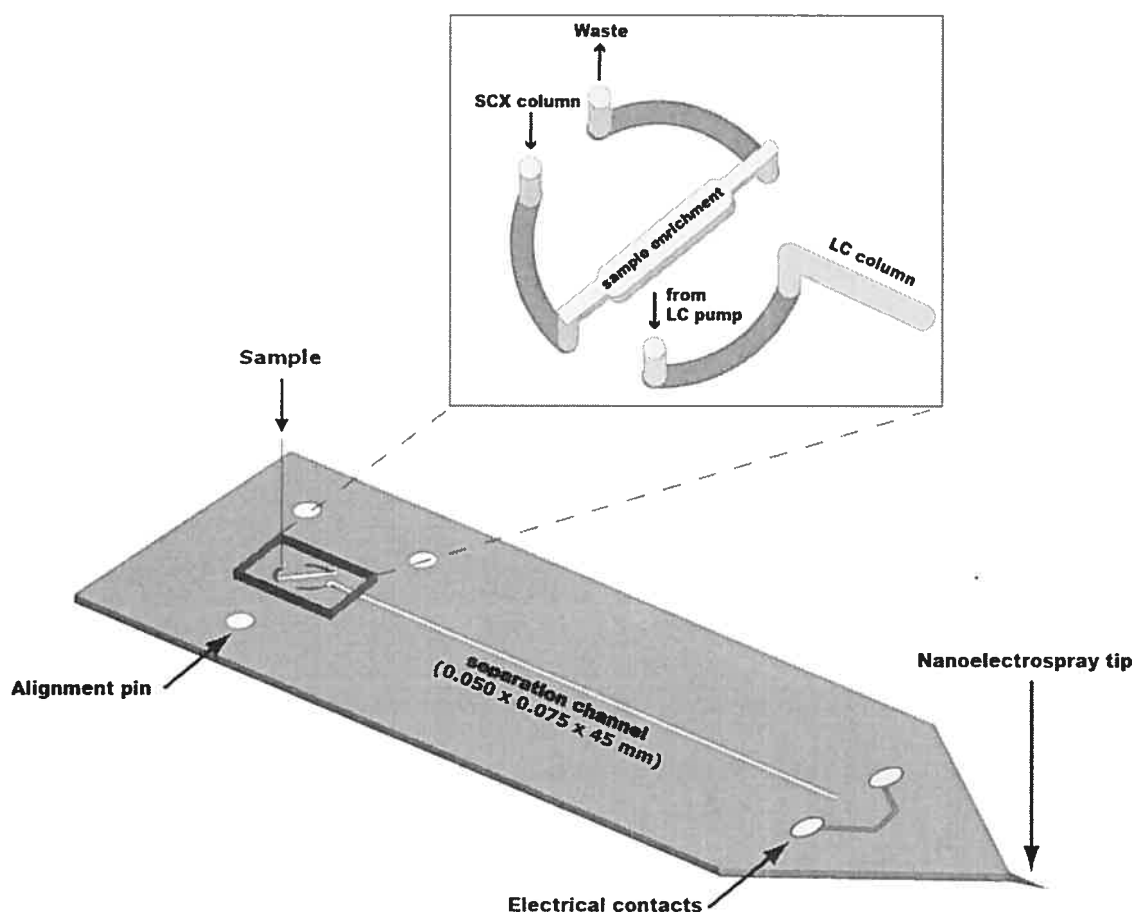


Figure 3.1 Schematic representation of the microfluidic chip interface integrating a 30 nL volume pre-column, a 4.5 cm length analytical column with a 75 x 50 μm cross section channel and a 10 μm i.d. nanoelectrospray emitter.

3.3.1 Evaluation of Chromatographic Performance of the LC-Chip-MS System

Preliminary experiments were performed to determine the reproducibility of the integrated nanoLC chip device packed with 3.5 μm Zorbax C₃ particles in the pre-column and 5.0 μm Zorbax C₁₈ particles in the analytical columns. A contour profile

(m/z value versus time and intensity) corresponding to the nanoLC-chip-MS analysis of a 5 μL injection of an eight-protein tryptic digest (100 fmoles of each protein) is presented in Figure 3.2a.

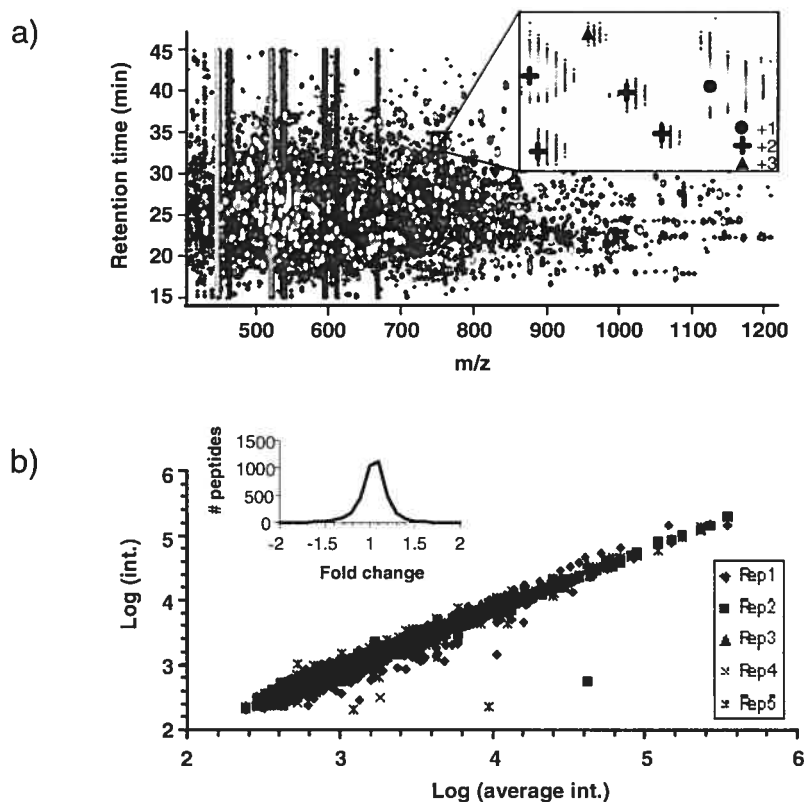


Figure 3.2 Separation of an 8-protein tryptic digest (100 fmoles each) using nanoLC-chip-MS (TOF). a) Contour profile of m/z vs intensity vs retention time. Peptide ions are displayed on a logarithmic gray scale of increasing intensity ranging from black to white. Inset shows a narrow region of the contour profile for m/z 740-775 and 32-34 min with singly-, doubly, and triply-charged peptide ions indicated by circle, cross and triangle, respectively. b) Scatter plot of intensity measurements for 5 replicates and 742 peptide ion clusters. Conditions: Trap channel: Zorbax C_{18} -5 μm ; separation channel: Zorbax C_{18} -3.5 μm .

This representation shows a two dimensional depiction of a three dimensional data set where m/z and time are shown on x and y- axes while ion intensity is displayed on a logarithmic gray scale grading. Each dot on this profile represents an individual peptide ion with specific m/z and time coordinates. Vertical lines at m/z 445,

519, 593, (SiO_2 clusters) etc. correspond to siloxane background ions that are typically observed in an open source configuration [120]. The commercial nanoLC-chip interface from Agilent now incorporates a vacuum manifold as part of the ionization source that significantly reduces contribution of siloxane ions.

To facilitate detection of peptide ions an in-house software program was used to analyze the peak profiles of all eluting components and identify all m/z values, time, charge state and intensity of the ^{12}C monoisotopic peptide ions. An example of peptide detection is shown as an inset to Figure 3.2a and highlights 6 peptide ions from a small region of the contour profile for m/z 740-775 and 32-34 min. Ions are identified as circle, cross and triangle for singly-, doubly- and triply-charged ions respectively.

Clustering analyses were obtained on five consecutive nanoLC-chip-MS runs to identify individual peptide clusters that were reproducibly detected across replicates. These analyses were performed using boundaries of ± 0.1 m/z and ± 1.0 min for identical charge state ions. In contrast to earlier studies [121], no time alignment was required across samples as reproducibility of retention time was typically less than 1 min for nanoLC-chip-MS analyses examined. The distribution of peptide clusters was then compared to determine the frequency of observation across all replicates. For example, a total of 742 peptide clusters were observed in all five nanoLC-chip-MS replicates and their distribution in intensity compared to average values are presented in the log-log scatter plot of Figure 3.2b. All ions are tightly distributed along a 45° angled line for all replicates indicating a narrow dispersion across more than three orders of magnitude in intensity. An expression plot of fold-change variation in intensity for peptide clusters reproducibly detected across all replicates (inset Figure 3.2b) revealed that 95% of peptide clusters showed a variation of less than $\pm 30\%$ (± 1.3 in fold change) confirming the good reproducibility of the present system. Larger variation in intensity measurements were observed for ions of lower intensities. Indeed, RSD values on intensity progressively increased from 5% for ions of 200,000 counts to 14 % for ions of 300 counts irrespective of elution time of peptide cluster. It is noteworthy that the reproducibility of m/z measurements performed using external calibration were typically within ± 30 ppm across replicates (data not shown).

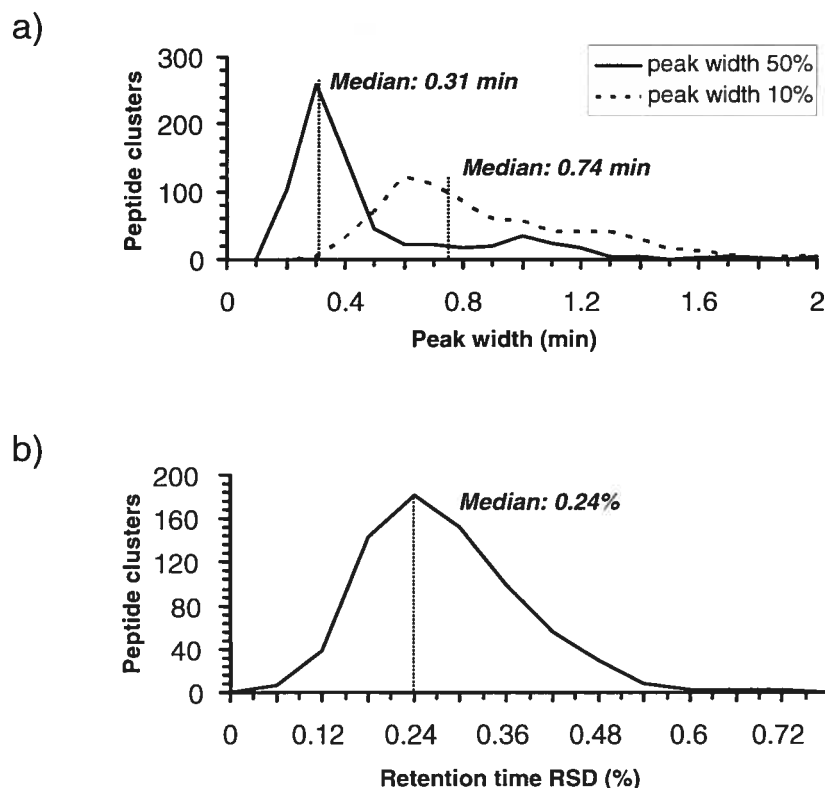


Figure 3.3 Distribution of peak width and retention time measurements on replicated nanoLC-chip-MS analyses of an 8-protein tryptic digest (100 fmoles each). a) Distribution of peak widths for measurements taken at 10 and 50% height. b) Distribution of RSD values on retention time measurements. Conditions as for Figure 3.2.

Peak profile analyses were also performed on the same nanoLC-chip replicates to determine the distribution of peak widths at 10 and 50% height and the reproducibility of retention times (Figure 3.3). As indicated from Figure 3.3a, these analyses revealed that peak widths at half height varied from 0.1-1.3 min with a median value of 0.31 min. Peak width measurements taken at 10% height showed a distribution extending from 0.3 min to 1.7 min with a median value of 0.74 min. Larger uncertainties on peak width at 10% height were attributed to higher variability in intensity values for low abundance ions approaching signal threshold (300 counts). Also, peak capacities were calculated from the peak widths and elution time window and provide an estimate of the number of components that can be separated to a specified resolution within a given separation space. An average peak capacity value was calculated from the ratio of

the elution time window and the peak width as described previously [122], and values of 70 and 150 were obtained for measurements taken at 10 and 50% height, respectively. It is noteworthy that an increase in peak capacity could be obtained using a shallower gradient resulting in longer analysis time. However, more appreciable gains in separation performance are expected by increasing the column length and/or using smaller particle size as will be discussed in the following section. Similarly, measurements performed on retention time attested to the good reproducibility of the present system with RSD values ranging from 0.1-0.7% with a median value of 0.24 % (Figure 3.3b). It is noteworthy that 95% of peptide ions reproducibly detected across all replicates showed RSD values less than 0.48% corresponding to variation in retention time below 15 s across the entire analysis. These results obtained were comparable to those obtained earlier on the same system using Jupiter C₁₈ packing material of 5 μ m particle size [43].

3.3.2 Enhancement of chromatographic performance using different reversed phase media

In order to improve the separation efficiency of the present chromatographic system, we evaluated the influence of stationary phase of different size (5, 3.5, 2.1 μ m) and alkyl chains (C₃, C₁₈). Out of all combinations of packing material in both the precolumn and analytical columns examined, three arrangements were retained and consisted of 5 μ m C₁₈ trap with 3.5 μ m C₁₈ column, 5 μ m C₃ trap with 3.5 μ m C₁₈ column, 5 μ m C₃ trap with 2.1 μ m C₁₈ column. A 5 μ L injection of BSA digest (120 fmoles of total protein) on the system was used to evaluate the chromatographic efficiency (peak width at half height) of the packed media. Examples of peak profiles for selected ion chromatograms are presented in Figure 3.4a for the three different stationary phase combinations. This figure clearly shows that reduced peak widths are typically observed for 5.0 μ m C₃ trap and 2.1 μ m C₁₈ analytical column.

Further statistical analyses were obtained on clearly identifiable peptide clusters with intensity higher than 10,000 counts that were reproducibly detected across all 3 chip combinations. Clustering analyses identified a total of 281 peptide clusters

fulfilling these selection criteria and figures of merit for these ions are shown in Table 3.1. The variation of intensity observed for all peptide clusters is presented in Figure 3.4b and indicates a narrow scatter for all three different chip configurations examined. A distribution of all 281 peptide clusters according to peak widths and stationary phase combination is shown in Figure 3.4c. These data indicated that a chip packed with smaller particle size provided smaller peak widths with higher separation efficiencies. Indeed, a median peak width value of 0.16 min was observed for the 2.1 μm particle compared to 0.21 min for the 3.5 μm particles. This observation is consistent with previous reports indicating that the use of smaller particles can significantly reduce the height equivalent of a theoretical plate through lowering the resistance to mass transfer of analyte molecules in the stationary phase, mobile phase, and stagnant mobile phase [111]. As particle diameter is decreased, the distance over which analyte molecules must diffuse to reach the particle surface decreases proportionally.

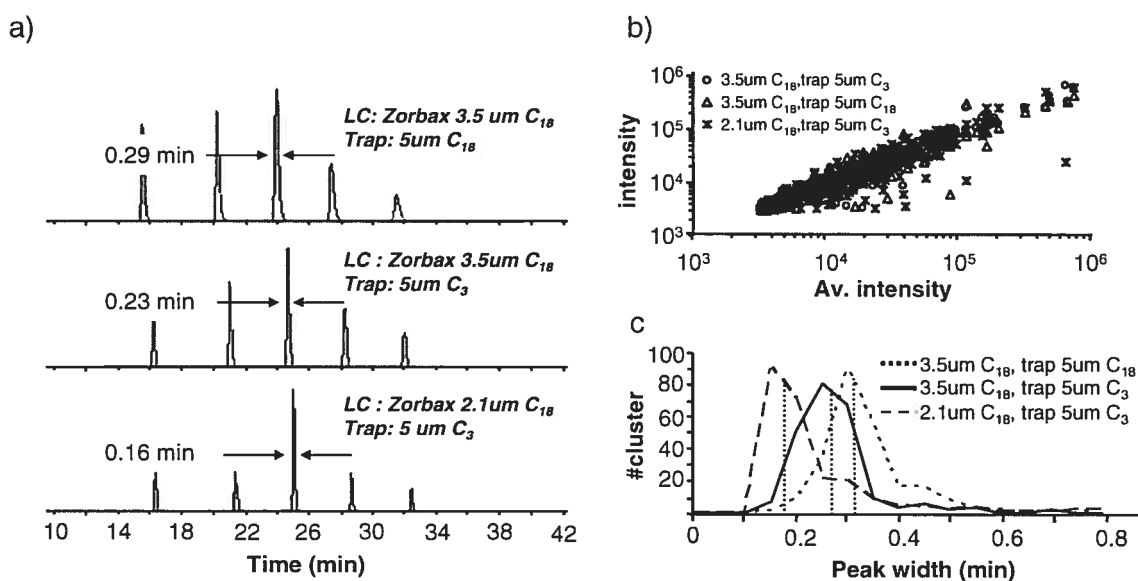


Figure 3.4 Evaluation of different Zorbax stationary phases by nanoLC-chip-MS (TOF). a) Extracted ion chromatogram for 5 selected ions. b) Comparison of intensity distribution for all three chromatographic phase combinations. c) Comparison of peak widths for 281 peptide clusters. Injection of 5 μL of BSA digest (120 fmols) was used in all analyses.

Figure 3.4c also indicates that the type of material used in the pre-column can also influence the chromatographic performance as observed for chips comprising C₃ or C₁₈ particles as trapping material. In this case, a median peak width value of 0.29 min was observed for the 5 μ m C₁₈ particle compared to 0.16 min for the 5 μ m C₃ particles. Earlier investigations using frontal chromatography reported that peak broadening in longer alkyl chains like C₁₈ is mainly caused by slower kinetic desorption between the stationary phase and the analytes [123]. Higher surface coverage are typically obtained for the C₃ particle compare to C₈ and C₁₈ due to enhanced polymeric bonding with trifunctionalized silanes although higher binding capacity are obtained for longer alkyl chains. The sharper peak shapes observed with C₃ than in C₈ and C₁₈ are likely due to the combination of higher surface coverage and faster desorption kinetics [123]. The results obtained here indicated that the use of shorter alkyl chain particle as pre-column combined with smaller size C₁₈ particle in the separation channel provided the narrowest peak width distribution. This reduction in peak width resulted in a two-fold improvement in peak capacity compared to the chip configuration using 5 μ m C₁₈ trap and 3.5 μ m C₁₈ column shown earlier (Figure 3.3a, Table 3.1).

Table 3.1 Figures of merit for different stationary phase configurations

Configuration	Median peak width ^{b)}	Asymmetry ^{c)}	Peak capacity ^{d)}	Total number of peptides detected
LC: C18-3.5 μ m Trap: C18-5 μ m	0.29 min	1.40	155	407
LC: C18-3.5 μ m Trap: C3-5 μ m	0.23 min	1.14	196	375
LC: C18-2.1 μ m Trap: C3-5 μ m	0.16 min	1.24	281	366

^{a)} Peak measurements were performed for 281 peptide ions common to all three configurations and for which intensity values were higher than 10 000 counts.

^{b)} From width at half height.

^{c)} From ratio of b to a for width at 10 % of peak height [17].

^{d)} From ratio of elution time window and peak width at half height.

3.3.3 Application to the identification of trace-level phosphoproteins

The selected preferred phase combination in conjunction with the good reproducibility of the present system on RSD values for retention time, m/z value and intensity measurements, as shown in the previous sections for replicate analyses, provides comfortable operating margins for peak detection across comparable samples. Tryptic peptides bearing phosphorylated residues represent a low proportion of the overall digests (typically < 2%) and their enrichment from the total digest is a necessary pre-requisite for their successful detection. In this context, different selective approaches such as immunoprecipitation [124, 125], immobilized affinity chromatography (IMAC)[126-128] and β -elimination followed by alkylation with affinity tag [129, 130] have been reported. For example, global phosphoproteome analyses were reported on a mg-scale of *Saccharomyces cerevisiae* protein extracts identified 365 novel phosphorylation sites using IMAC in which hydrolysate had been methylated to block the binding of unphosphorylated aspartate and glutamate-containing peptides [128]. While affinity enrichment using techniques such as IMAC, β -elimination, and immunoprecipitation have facilitated phosphoproteome analyses, the selection of the most appropriate technique must be balanced with the quantity of available sample, extent of quantitative derivatization and side reaction products, and the complexity of sample purification. In this context, we evaluated the use of commercially available IMAC Ga(III)-loaded gel for the enrichment of unlabeled phosphopeptides, an enrichment medium providing enhanced selectivity compared to Fe(III) as the affinity metal [127].

To evaluate the analytical potential of the present microfluidic device for the profiling and identification of phosphopeptides, we first compared the detection limits for complex protein digests of J774 mouse macrophage cell extracts spiked with increasing amounts of α -casein tryptic digests. Figure 3.5a shows a clustergram taken from more than 1500 peptide ions across the spike levels ranging from 1.5 to 12 fmols of α -casein in 200 ng of J774 tryptic digest. In this logarithmic gray-scale representation, the intensity of peptide clusters transition from black to white to indicate ions of increasing intensity.

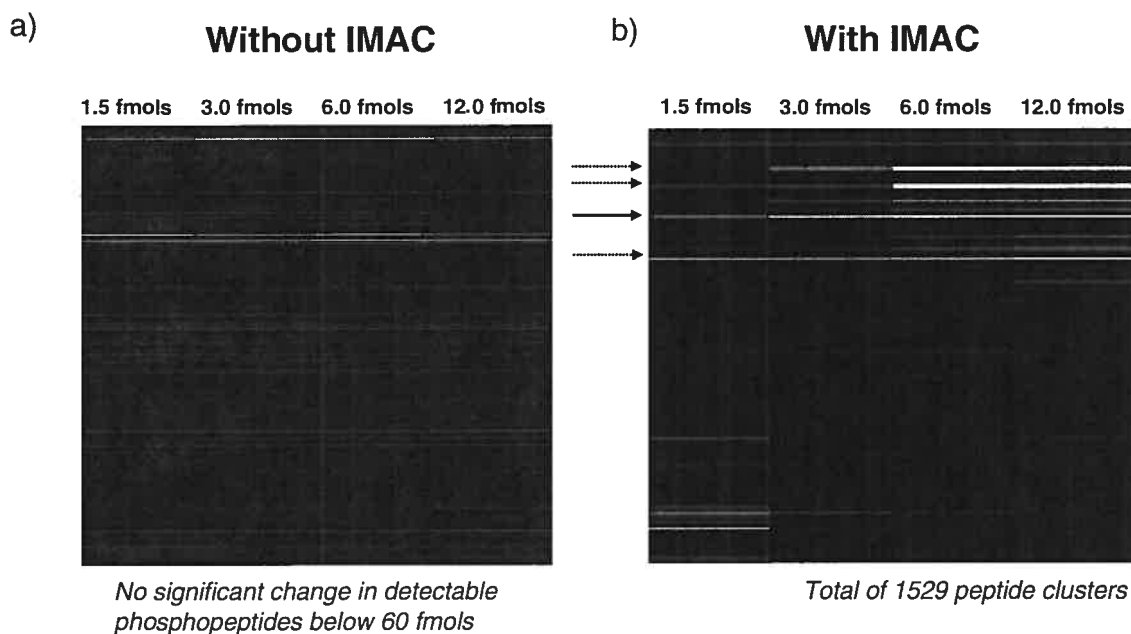


Figure 3.5 Identification of α -casein phosphopeptides spiked at different levels in a tryptic digest of mouse macrophage J774 protein extract. Clustergram of peptide cluster ions across different spike levels without (a) and with (b) IMAC enrichment. Ions of increasing abundance are transitioning from black to white on the logarithmic gray scale display. Clusters identified by dash arrows correspond to phosphopeptides ions showing a linear increase across spike levels. The solid arrow represents the doubly-charged m/z 733.78 corresponding to TVDMEpSTEVFTK from α S2 casein.

As observed, no significant changes in peptide abundance were observed across the spike level examined. The same spiked samples (400 μ g loaded) were applied to IMAC Ga (III) enrichment columns and 10% of the reconstituted extract was analyzed on the nanoLC-chip-TOF system. The corresponding clustergram analysis is presented in Figure 3.5b and clearly identifies 4 peptide clusters (arrows) showing a progressive increase in intensity that is correlated with α -casein spike levels.

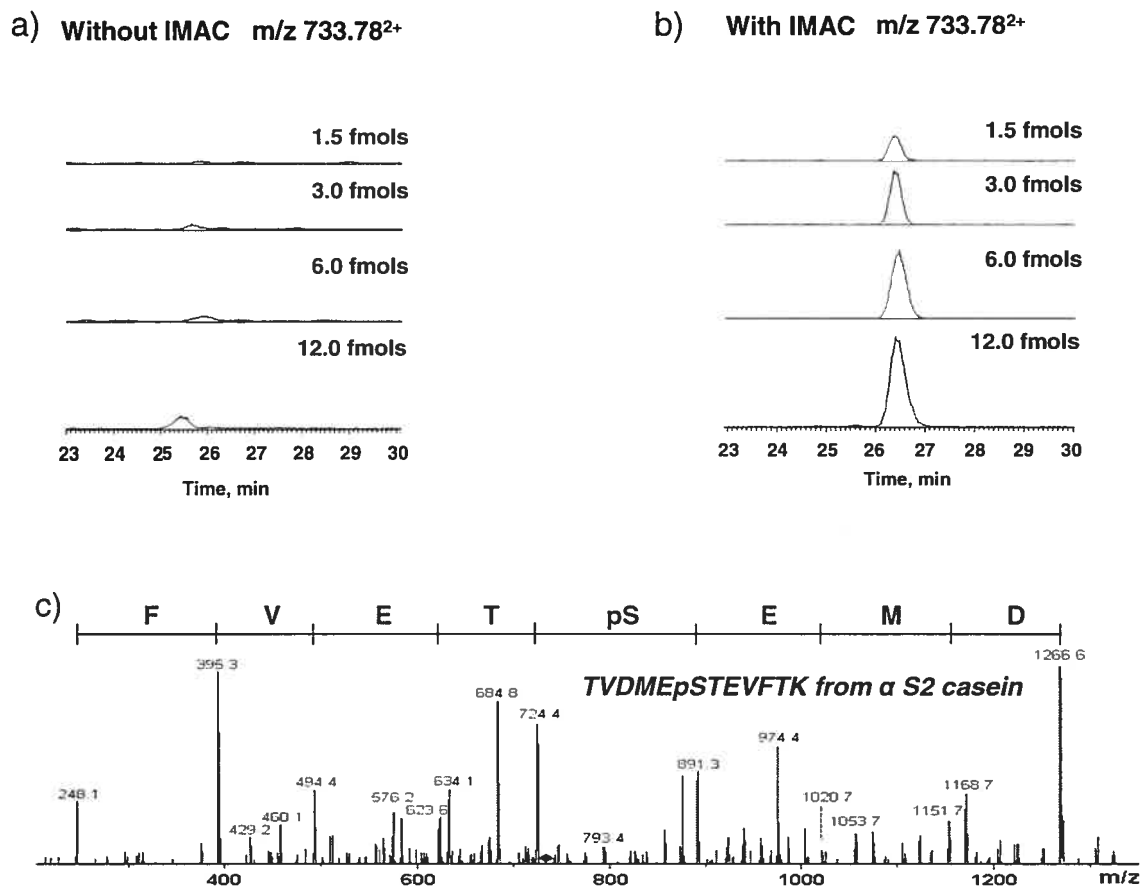


Figure 3.6 Targeted identification of phosphopeptide from α -casein spiked at different levels in a tryptic digest of mouse macrophage J774 protein extract. Reconstructed ion chromatograms of m/z 733.78 from nanoLC-MS analyses without (a) and with (b) IMAC enrichment. Ion intensities are normalized to that of IMAC 12.0 fmols spike. c) MS-MS spectrum of m/z 733.78 confirming the identification and site of phosphorylation of tryptic peptide TVDMEpSTEVFTK from α S2 casein.

The reconstructed ion chromatograms of the peptide cluster m/z 733.78²⁺ identified by a solid arrow on Figure 3.5b are shown in Figure 3.6 for digests subjected or not to IMAC enrichment. Reliable detection with signal to noise ratio (S:N) above 4:1 in non-IMAC isolated digest required at least 6 fmols of α -casein (Figure 3.6a) whereas a S:N ratio exceeding 130:1 for this peptide was obtained for the same spike level following IMAC isolation (Figure 3.6b). An overall enrichment of approximately 25-fold was typically achieved on all four phosphopeptides detected following IMAC

enrichment. Confirmation of the phosphopeptide identity was obtained using the nanoLC-chip system interfaced to an Agilent XCT ion trap mass spectrometer (Figure 3.6c). The MS-MS spectrum showed consecutive series of y-type fragment ions from which a sequence string TVDMESTEVFTK from α S2 casein was derived. The site of phosphorylation was assigned to the Ser residue as fragment ion m/z 793.4 harbored the characteristic loss of H_3PO_4 moiety through a β -elimination giving rise to a dehydro alanine residue shifted by 69 Da from its adjacent y-type fragment ion at m/z 724.4. It is noteworthy that other α -casein phosphopeptides were also identified from the same samples including VPQLEIVPNpSAEER, KTVDMEpSTEVFTK (skipped cleavage site) and DIGpSEpSTEDQAMEDIK. The present approach thus provided a meaningful method to detect statistically relevant changes in phosphopeptides abundance through IMAC enrichment while suspected candidates can be subsequently identified using nanoLC-chip with tandem mass spectrometry.

3.3.4 Phosphoproteome analyses of U937 cells following the exposure to phorbol ester

In order to probe phosphoproteome changes taking place in a more complex biological context, we examined early signaling events in differentiating cell model systems subjected to chemical stimulation and potent tumor promoting agents. Treatment of human monoblast lymphoma cell line U937 with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) has profound effects on cellular control of growth and results in terminal differentiation of the cells into a macrophage-like phenotype [116-118, 131]. In the present experiment, U937 monoblast cells were split in two after 3 days of culture to yield control and PMA-exposed (150 nM PMA, 1h) cell extracts. Following cytosol protein extraction, and BCA quantitation, extracts were digested with Lys-C/trypsin and 400 μ g of the corresponding digests were subjected to IMAC isolation. Enriched phosphopeptide samples (10% of the IMAC fractions, approximately 200 ng inj.) were analyzed in triplicate on the nano-LC-chip-TOF system.

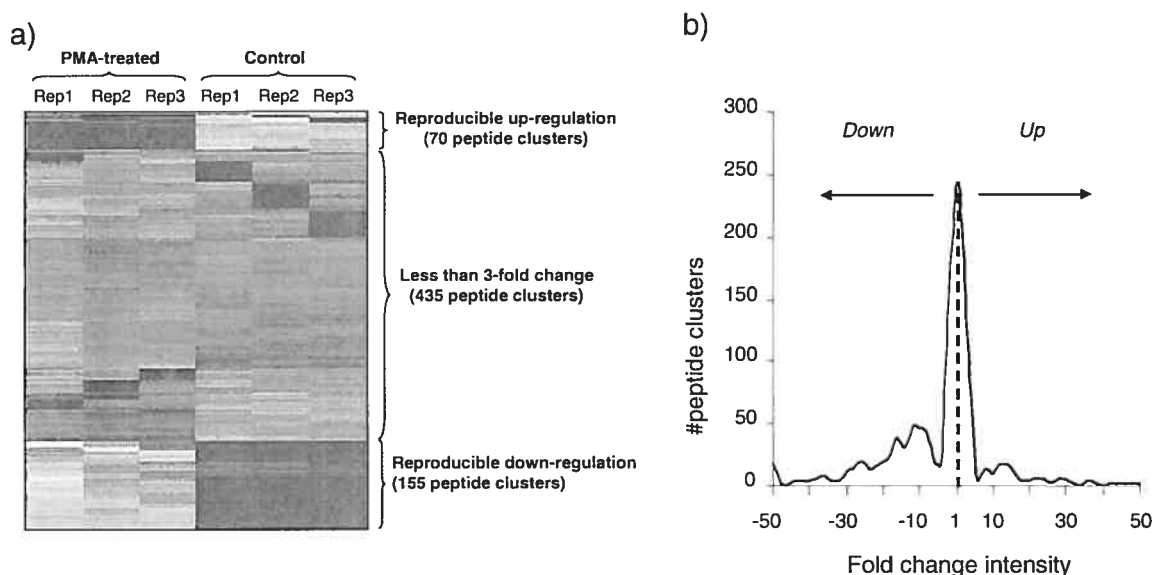


Figure 3.7 Phosphoproteome analysis of U937 cells following PMA challenge (200 ng of protein digest used for each injection). a) Clustergram of intensity distribution for 660 randomly selected peptide clusters from a total of 2624 detected peptide ions across nanoLC-chip-MS (TOF) analyses of control and PMA exposed samples. b) Expression plot showing the number of up-regulated (9 %), down-regulated (33 %) and unaffected (58 %) phosphopeptides from a total of 2624 peptide clusters.

A total of 2624 peptide ion clusters (reproducibly observed in at least 2 replicates) were obtained from these analyses. For convenience, a representative set of 660 peptide ion clusters corresponding to 25% of the total population is shown in the clustergram of Figure 3.7a. As indicated, 435 out of a total of 660 peptide ion clusters were either unaffected or showed less than 3-fold change in intensity following PMA incubation. However, significant changes in abundance were observed in both up-regulation (70 peptide clusters) and down-regulation (155 peptide clusters) for protein extracts obtained from control and PMA-exposed cells. Similarly, Figure 3.7b shows the distribution of average intensity ratio between control and PMA extracts for all ions including up-regulated (9%), down-regulated (33%) and unaffected (58%) peptide clusters. It is noteworthy that a similar distribution was obtained for tryptic peptides not subjected to IMAC isolation (15.3 % up-regulated 20.1% down-regulated and 64.6 % unaffected, data not shown) suggesting that variations in phosphoproteome are consistent with overall protein expression changes. Differential phosphorylation for

given phosphoproteins must take into account individual changes in protein abundance to validate whether or not cell signaling events and protein expression undergo independent regulation.

Confirmation of up-regulated and down-regulated phosphopeptide clusters upon PMA treatment was achieved by conducting nanoLC-chip-MS-MS experiments on an ion trap mass spectrometer. For example, Figure 3.8a shows the reconstructed ion chromatogram for m/z 754.3²⁺, showing a consistent up-regulation by at least 3.5-fold in the PMA-treated compared to control cells. Tandem mass spectrometry analyses of the corresponding doubly-charged peptide ion (Figure 3.8b) revealed the partial sequence DpSPKR which upon data search using Mascot was identified as the human hepatoma-derived growth factor. The phosphorylation site was assigned to Ser165 consistent with recent reports on cell nuclear phosphoproteins from HeLa cells [132].

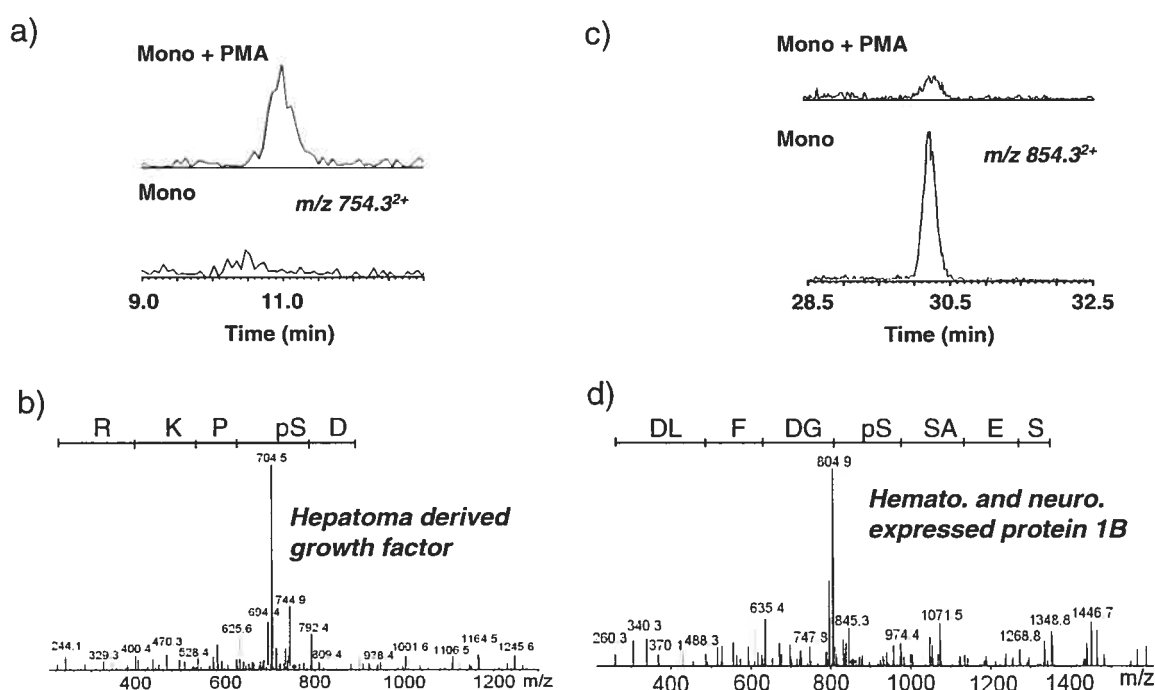


Figure 3.8 Identification of differentially expressed phosphoproteins from U937 cells following PMA administration. Reconstructed ion chromatograms of (a) m/z 754.3²⁺ and (c) 854.3²⁺ showing differential abundance in control and PMA exposed cells. MS-MS spectra of (b) m/z 754.3²⁺ and (d) 854.3²⁺ confirming the protein identification and the site of phosphorylation.

The sequence motif of phosphorylation is similar to that observed for proline-dependent Ser/Thr kinase group such as CDK2 kinase. Interestingly, this protein was identified as differentially regulated in transformed cells and immunohistochemical analysis of human tissue biopsies showed strong expression of this protein in early and late stage melanomas [133]. In contrast, peptide ion m/z 854.3²⁺ was found to be down-regulated by 11-fold upon PMA treatment (Figure 3.8c). The MS-MS analyses of this peptide ion revealed the partial sequence SEASpSDGFLD identified to hematological and neurological expressed protein 1B (HN1), a protein of unknown function (Figure 3.8d). Here again the phosphorylation site was assigned to a Ser residue but with an unknown phosphorylation motif. It is noteworthy that recent reports on murine lymphoma cell line WEHI-231 also identified this peptide phosphorylated at the same Ser residues attesting of the sequence homology with the human [134].

These examples highlight the analytical capabilities of the present microfluidic systems whereby subtle changes in protein expression and phosphorylation can be identified with reproducibility and sensitivity. The ability to compare ion profiles across different biological conditions facilitates the identification of differentially expressed peptide ion clusters. Targeted MS-MS experiments can then be launched more effectively using a list of priority precursor ions hence maximizing both sample utilisation and the collection of relevant product ion spectra.

3.4 Conclusion

The coupling of nano-scale liquid chromatography to electrospray mass spectrometry offers remarkable advantages for in proteomics analyses including sub-fmole detection limits, enhanced peak capacity and sample loading through multi-dimensional chromatography. However, the integration of all necessary chromatographic, fluidics and valves components often rely on transfer lines and fused silica columns which can significantly reduce the overall analytical performances and ruggedness of the system. In the present study, we described a compact polymeric microfluidics device which integrates together a sample enrichment column, a separation column and nanoelectrospray tip thus significantly reducing dead volumes and

connections. In spite of its small size, this modular nanoLC-chip system provides analytical performances comparable to those of capillary chromatography columns of 75 and 150 μm i.d. Peak measurements taken on more than 700 reproducibly detected peptide ion clusters indicated that more than 95% of the ion population showed a variation of less than 30% across 3 orders of magnitude in intensity. Excellent reproducibility of retention time (RSD: 0.24 %) and mass measurements (0.003 %) were obtained for the nanoLC-chip device coupled to a time-of-flight instrument. Different adsorbant media can be incorporated into microfluidic channels to enhance the selectivity and chromatographic performances of this system. The combination of IMAC selection prior to microfluidic separations facilitated the identification of phosphopeptides present at only 1.5 fmoles in complex protein digests. This capability was demonstrated in the context of differential phosphoproteome analysis to identify early signaling events following chemical stimulation of human monoblastic cells U937. Reproducible expression measurements from an enriched population of phosphopeptides enabled the detection and identification of up-regulated and down-regulated ions representing 9 % and 33% of the overall peptide population. Targeted tandem mass spectrometry experiments on an ion trap mass spectrometer enabled the identification of phosphopeptides and location of modification sites on up-regulated and down regulated phosphoproteins such as the hepatoma derived growth factor and hematological and neurological protein 1B, respectively. More importantly, the ease of use, ruggedness, reliability of the present system combined with its ability to mine complex data sets with high sensitivity and reproducibility provides a powerful identification and protein expression platform to any proteomics and drug discovery programs.

Acknowledgements

We thank Agilent Technologies for providing early access to the prototype nanoLC-chip-MS system, and MSD ion trap XCT mass spectrometer. We are also grateful to Agilent staff members Dr. John Michnowicz and Georges Gauthier for their helpful support and assistance, Debbie Ritchey and Reid Brennan, Linda Cote and Sebastien Marchand for technical support. Finally, we acknowledge Christelle Pomiès (IRIC) for cell culture and G. Jaitly (IRIC) and N. Jaitly (PNNL) for invaluable assistance with the peptide detection and clustering algorithms.

4. Modular microfluidics devices combining multi-dimensional separations; Applications to targeted proteomics analyses of complex cellular extracts⁵

Mihaela Ghitun, Eric Bonneil, Christelle Pomiès, Maria Marcantonio, Hongfeng Yin, Kevin Killeen, Pierre Thibault, in *Miniaturization and mass spectrometry*, Séverine Le Gac & Albert van den Berg (Eds.), Royal Society of Chemistry.

Submitted on: October 10, 2006.

⁵ Les références de ce chapitre se retrouvent à la section 7

Abstract

We report the fabrication of a versatile microfluidic device integrating microchannels etched into a Kapton® polymer substrate and packed with C₁₈ reversed phase media for the separation of protein digests using nano-scale liquid chromatography-nanoelectrospray mass spectrometry (nanoLC-chip-MS). Comprehensive data mining on more than 2200 reproducibly detected peptide ions from replicate nanoLC-chip-MS analyses of protein digests (n = 5), provided RSD values of ± 0.22 % on retention time (± 3 s), ± 30 ppm on m/z measurement and less than ± 20 % variation of intensity over 3 orders of magnitude. On a C₁₈ trap of 40 nL bed size, a linear response in peak intensity with minimal peak broadening was maintained up to 200 ng sample loading. The integration of a strong cation exchange (SCX) column provided an increase in sample loading (> 1 μ g) with reproducible chromatographic performance over several consecutive days (> 95 % detected ions showing < 40 % variation in intensity). Enrichment of low fmoles phosphopeptides from cell extract digests was facilitated using TiO₂ media prior to microfluidic separations. These reproducible chromatographic and mass spectrometry performances enabled confident peptide identification in the context of proteome analyses of differentiated cell model systems. Examples of application are shown for expression profiling and targeted identification of tryptic peptides and phosphopeptides from U937 human monocytes after incubation with phorbol ester (PMA).

4.1 Introduction

The pursuit of sensitive and reproducible protein expression and identification from minute amounts of cell extracts presents significant analytical challenges and new opportunities for the development of efficient separation techniques. The compelling advantages of microfluidics in terms of speed, reduced sample handling and reagent consumption together with the capabilities of conducting different sample processing steps on a device of small footprint offer a promising separation platform for proteomics analyses [135]. These remarkable features combined with those available from sensitive mass spectrometry techniques have led to the development of innovative approaches for trace-level protein analyses, and an excellent review describing the technologies and applications of microfluidic-mass spectrometry was published recently [136].

Early reports of microfluidic devices interfaced to nanoelectrospray mass spectrometry were presented almost 10 years ago and described compact separation modules based on zone electrophoresis separation [4-8]. Since then, other separation formats have also been reported to increase the overall peak capacity including electrochromatography [9, 10], micellar electrokinetic chromatography (MEKC) [11, 12] and hyphenated approaches combining MEKC [13] or solid phase extraction [14] to zone electrophoresis separation. Enhancement of sample loading using sample stacking or adsorption preconcentration was later described to alleviate the limitations in concentration detection limits typically observed in electrophoretic-based separation methods and provided sub-nM detection limits [6, 17, 18]. A microfluidic device using on-line micro pipette tip sample desalting for subsequent serial introduction to the mass spectrometer was reported and led to numerous applications including quantitative analyses of drugs in plasma [26, 137] and screening of non-covalent protein-protein and protein-ligand interactions [27].

Although the on-line coupling of microfluidic devices to mass spectrometry was largely documented for electrospray ionization, microanalytical platforms using matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) also provided meaningful advantages including the capability of conducting single or parallel sample separation for high throughput analysis [21-23]. More recently, the combination of electrospray

target preparation with off line MALDI-MS was described and improved the homogeneity of sample morphology for reproducible proteomics analyses compared to mechanical sample deposition technique [25].

Microfluidic devices combining nano-scale liquid chromatography separation formats were first introduced using wall derivatization [109] or by UV-initiated polymerization of monolithic materials into a microchannel [110, 138-140]. These monolith-based microfluidic devices provided high mechanical strength and low flow resistance with reduced risk of clogging but suffered from lower sample loading capacity compared to the traditional particle-based stationary phase. Subsequent embodiment incorporated particulate adsorbant into chip channels fabricated out of glass [29], silicon [141] or polymeric material [142, 143]. Recent advances in the field of microfluidic-mass spectrometry have enabled the incorporation of all necessary fluidic components including electrochemical pumps on a single chip [30, 31]. In addition to the embedded nanoelectrospray emitter, these chips included multi electrolysis-based electrochemical pumps, sample loading and gradient delivery together with a low-volume static mixer, a C₁₈ column and integrated frits for particle capture. Examples of applications were demonstrated for the separation and identification of a few hundred fmoles of protein digests [31] with chromatographic performance comparable to those of commercial nanoflow LC system.

Although the field of microfluidics-mass spectrometry has literally bloomed over the past decade, it has not yet received its revolutionary impact. At the root of its overall acceptance lies the requirement of versatile modular components and subsystems, and their integration into complete functional and reliable devices that can be used by non-experts. It is in that perspective that we embarked on the development of an integrated microfluidic device tailored to address the analytical requirements sought for reproducible and sensitive proteomics analyses. Our quest for a functional and integrated microfluidic device for proteomics analyses brought us to examine compact nano-scale LC-MS chip platform (nanoLC-chip-MS) that integrated all necessary elements for sample preconcentration, separation and ionization into a single chip [43, 44]. These integrated microfluidic systems enabled sensitive and reproducible

expression profiling of proteins at levels of 2-5 fmoles in plasma samples [44] and provide a versatile sample introduction format for phosphoproteome analyses [144].

In the present work, we examine the analytical capabilities of the nanoLC-chip-MS system for complex proteome analyses of differentiated cell model systems. Enhancement of chromatographic capacity and sample loading was obtained by combining on-line two-dimensional chromatography separation using strong cation exchange (SCX) and reversed phase C₁₈ media. Application of this multi-dimensional nanoLC-chip-MS system is demonstrated using both ion trap and time-of-flight (TOF) mass spectrometers for expression profiling and protein identification of differentiated U937 monocyte cells following the administration of phorbol ester. Early signaling events resulting from this chemical stimulation were examined following the identification of phosphopeptides from the corresponding protein digests using TiO₂ enrichment.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Materials

HPLC grade water and acetonitrile were purchased from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). Formic acid (FA), ammonium acetate and ammonium bicarbonate were obtained from EM Science (Mississauga, ON, Canada). Monocytic U937 cells were purchased from ATCC (Manassas, VA). Dimethyl sulfoxide (DMSO), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), acetic acid, acetone were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Reduced and iodoacetamide alkylated protein digests (bovine serum albumin, rabbit aldolase, yeast alcohol dehydrogenase, bovine catalase, bovine glyceraldehyde 3P dehydrogenase, *E. coli* glycerokinase, human lactotransferrin, bovine lactoperoxidase) were purchased from Michrom Bioresources (Auburn, CA).

4.2.2 Cell cultures

U937 (human monocyte like, histiocytic lymphoma cells, ATCC, Manassas, VA) were grown in RPMI-1640 (Hyclone, Logan, Utah) and, supplemented with 10 %

Fetal Bovine Serum, 1% Pen-Strep (Hyclone) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were plated in 150 mm Petri dishes at a density of 0.5 million cells/mL in a total of 250 mL culture medium. Concentrated PMA in DMSO was added to U937 cell cultures to a final concentration of 150nM and cells were incubated with PMA for 1h.

4.2.3 Protein extraction and digestion

Cells were resuspended in 10 mM Tris (EMD Biosciences, Gibbstown, NJ), 2mM MgCl₂ (Sigma, St Louis, MO), 3 mM CaCl₂ (Sigma), sucrose 300 mM (Sigma). Cells lysis was performed using a metal douncer homogenizer. After centrifugation at 10000g for 10min, the proteins in the supernatant were precipitated with acetone. Proteins were resuspended in 100 mM ammonium bicarbonate reduced in 10 mM DL-dithiothreitol (Sigma) for 1h at 56°C and then alkylated in 55mM iodoacetamide (Sigma) for 1h at room temperature. Total protein amount was quantitated by BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL). Proteins were digested in 1 M urea (Sigma), 50 mM ammonium bicarbonate with Lys-C (Wako Chemicals, Richmond, VA) for 4h at 37°C and then with Promega trypsin (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) overnight at 37°C. Samples were evaporated to dryness. For phosphopeptide enrichment of U937 cell extract, proteins were digested overnight at 37°C with trypsin in 0.1% SDS, 50 mM ammonium bicarbonate. The digest mixture was acidified with trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma) and then evaporated to dryness.

4.2.4 Phosphopeptides isolation

Phosphopeptide enrichment used a protocol similar to that described previously [145]. Sample loading, washing and elution were performed by applying gas pressure from a nitrogen tank to the microcolumn. Each microcolumn was used once to avoid contamination. In-house TiO₂ (GL Sciences, Japan) microcolumns were equilibrated with 10 µL 0.1% TFA. The digest mixture was redissolved in 350 mg/mL 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (Aldrich, USA), 3% TFA, 70% acetonitrile. 250 µg (50 µL) of sample were loaded onto the 1.25 mg TiO₂ microcolumn. The column was washed first with 10 µL of 350 mg/mL DHB, 3% TFA, 70% acetonitrile and then 2

times with 30 μ L of 3% TFA, 70% acetonitrile. The bound phosphopeptides were eluted with 30 μ L of 1% ammonium hydroxide (Sigma-Aldrich). The eluate was acidified with 2 μ L of TFA and 15 μ L of the enriched sample was injected on the nano LC-chip-MS system.

4.2.5 Nano chip LC and 2DLC analyses

The microfluidic devices all comprised laser-ablated channels (enrichment/trap volume of 40 nL; LC separation channel of 43 x 0.075 x 0.050 mm, (160 nL)) packed with Zorbax C₁₈ separation media and connected to a nano-electrospray tip (Figure 4.1). All analyses were performed using a nanoLC1100 system coupled to a TOF or an ion trap XCT mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The strong cation exchange column (SCX) (0.5 mm i.d. x 8 cm) was packed with PolyLC stationary phase (5- μ m diameter, 300 Å pore size). The SCX column was connected directly to the switching valve and was on-line with the chip C₁₈ precolumn during sample loading, and toggled off-line during reversed-phase peptide separation on the analytical column. Peptides were sequentially eluted from the SCX column onto the C₁₈ precolumn with 8 salt fractions of ammonium acetate (0, 50, 75, 100, 150, 300, 1000, 2000 mM, pH 3.5). Each 10 μ L fraction was loaded at 4 μ L/min for 15 min. Peptides were eluted from the reversed phase column into the mass spectrometer using a gradient from 8% to 60% B over 61 min. The nanoelectrospray voltage was set to 2100 V. Tandem mass spectra were acquired with the Agilent MSD Trap XCT mass spectrometer using He as a collision gas. Multiply charged ions with an intensity above 40,000 counts were selected for MS/MS sequencing. The MS/MS fragmentation amplifier voltage was set to 1.3V.

4.2.6 Peptide detection and clustering

Raw data files (*.wiff) generated from the TOF acquisition software were read and processed using in-house peptide detection software to identify all ions according to their corresponding m/z values, retention time, peak widths, intensity and charge state. Intensity values above a user-defined intensity threshold above the

background noise (typically 300 counts) were considered. A list of unique peptide ions (peptide cluster) found across relevant replicates of nano LC-chip-MS analyses was obtained by clustering ions based on their respective charge, m/z and time within user-specified tolerances (typically ± 0.05 m/z and ± 0.5 min) following alignment of retention times using dynamic time warping. Segmentation analyses were also performed across sample sets from different cell growth conditions (e.g. control and challenge) by comparing the intensities of peptide clusters to identify those showing reproducible and statistically meaningful changes in abundance. For two-dimensional nano LC-chip-MS separation, the intensities of unique and aligned peptide clusters present in contiguous fractions (typically ± 1 fractions from most abundant) were summed to obtain the total contribution of each peptide cluster. Segmentation analyses across replicates and conditions were performed as described above.

4.2.7 Database searching with mass spectrometry data

Database searches were performed against a non-redundant NCBI database using Mascot (Matrix Science, London, UK) and narrowing the search criteria to human and/or rodent species. Parent ion and fragment ion mass tolerances were both set at ± 0.6 Da.

4.3 Results and discussion

The present microfluidic device differs slightly from similar systems previously reported by our group [43, 44, 144]. The chip device integrates a 40 nL enrichment column, a 4.3 cm analytical column (75 x 50 μm cross section channel) and a 10 μm i.d. nanoelectrospray emitter directly on a polymer surface which is itself encased into an aluminium holder for convenient manipulation (Figure 4.1a). An on-line filter (0.5 μm pore size) is positioned between the valve stator and the nanopump to prevent occlusion of the chip device. The chip is mounted in a clamping mechanism enabling automatic alignment and proper sealing of the chip within the manifold. The chip is secured in position between a stator-rotor with a dual concentric multiport rotor

that provides 360° rotation for both rotors (Figures 4.1b, 4.1c). The inner and outer rotors can rotate simultaneously in the same direction or in opposite directions in 1-degree increments. Pressure sensors on the chip manifold also monitor proper sealing of the microfluidic device with the rotor-stator assembly. Section 4.4.1 describes the figures of merit typically achievable for this device for trace-level protein analyses.

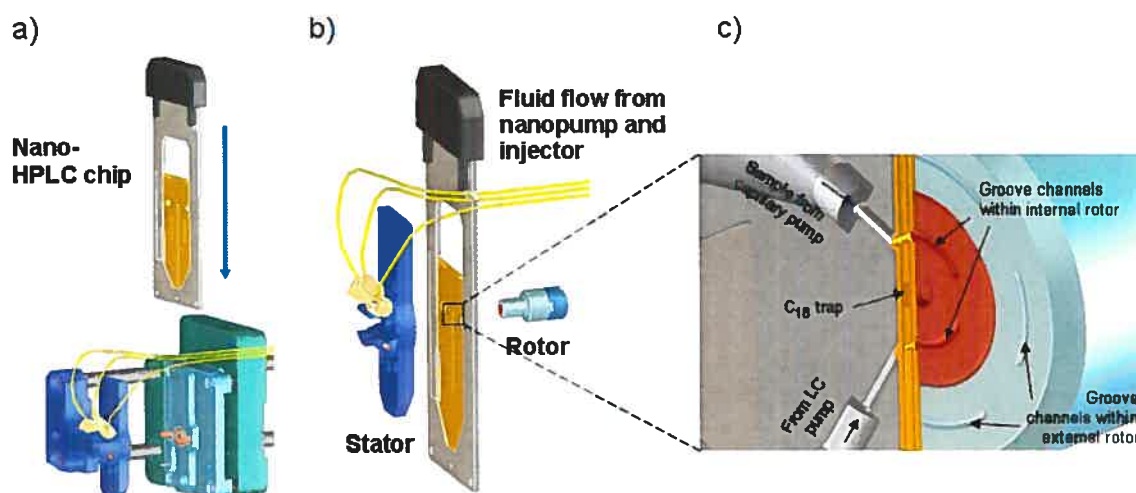


Figure 4.1 Schematic representation of the microfluidic chip cube interface comprising automated chip loading and sealing mechanisms. a) Detail of the valve assembly below a polymer chip in its carrier (a metal frame). Alignment pins enable proper insertion and chip localization. The arrow indicates the direction of chip insertion. b) Exploded view presenting the chip positioned between the rotor and stator assembly. c) Cut-out view of the chip device and fluidic connection on the switching valve.

4.3.1 Reproducibility of chromatography and mass spectrometry performances of the LC-Chip-MS System

The analytical performance of this device in terms of reproducibility, sensitivity and linear dynamic range were evaluated in the context of proteomics research using a pooled tryptic digest of 250 fmol/protein of 8 standard proteins. It is noteworthy that this sample also contained additional unexpected proteins, the most abundant being chaperonine 10, leucine aminopeptidase, bovine quinolinate phosphoribosyltransferase, bovine enoyl-CoA hydratase precursor, bovine

argininosuccinate lyase, *E. coli* dehydrin. This sample was selected to mimic the sample complexity typically observed for in-gel digest or salt fractions from two-dimensional liquid chromatography separation of protein digests. Chips were packed with 5.0 μm -sized Zorbax particles in the pre-column and 5.0 μm -sized Zorbax particles in the analytical column and replicate injections ($n=5$) were performed on the nano LC-Chip interfaced to a TOF mass spectrometer. Reproducible retention times and peak profiles were obtained as indicated from the overlay ion chromatograms of the five replicate analyses (Figure 4.2a). Comprehensive peptide detection was achieved using in-house software program to identify all eluting components and their corresponding m/z , elution time, charge state and intensity [43, 144]. Segmentation analyses were obtained by grouping each peptide ion across replicate runs using boundaries of ± 0.1 m/z and ± 1.0 min for identical charge state ions. No time alignment was performed for these analyses. Consistent with previous investigations, the vast majority of peptide ions were reproducibly detected across all replicates and a total of 2230 peptide clusters (groupings) were observed in all 5 replicates. A distribution of their intensities compared to the average values is presented in the scatter plot of Figure 4.2b. Ion intensities are closely nested along the median line with larger variations observed for ions of lower intensity. An average RSD value of 10 % was observed for ions of less than 2000 counts and decreased progressively to 7 % for ions above this intensity level. This distribution is best visualized on the inset of Figure 4.2b, which shows a frequency plot of the fold-change variation in intensity for all reproducibly detected peptide ions where 95 % of peptide clusters showed less than ± 20 % variation (± 1.2 fold change) in intensity. Similarly, mass measurements performed on the same peptide ions (data not shown) using external calibration were all within ± 30 ppm across all m/z values attesting of the good reproducibility of this system. Peak profile analyses were also performed to determine the reproducibility of elution times and the variation of peak widths at 10 and 50 % height. The distribution of RSD on retention times (Figure 4.2c) is well within 1% with a median value of 0.22 % or $\pm 3s$. Peak width measurements (50 % height) obtained for 360 the same peptide ions higher than 10000 counts showed a distribution extending from 0.07 min to 1.14 min with an average value of 0.29 min. The peak

capacity calculated from the average peak width and elution window was 152 consistent with previous reports on similar devices [144].

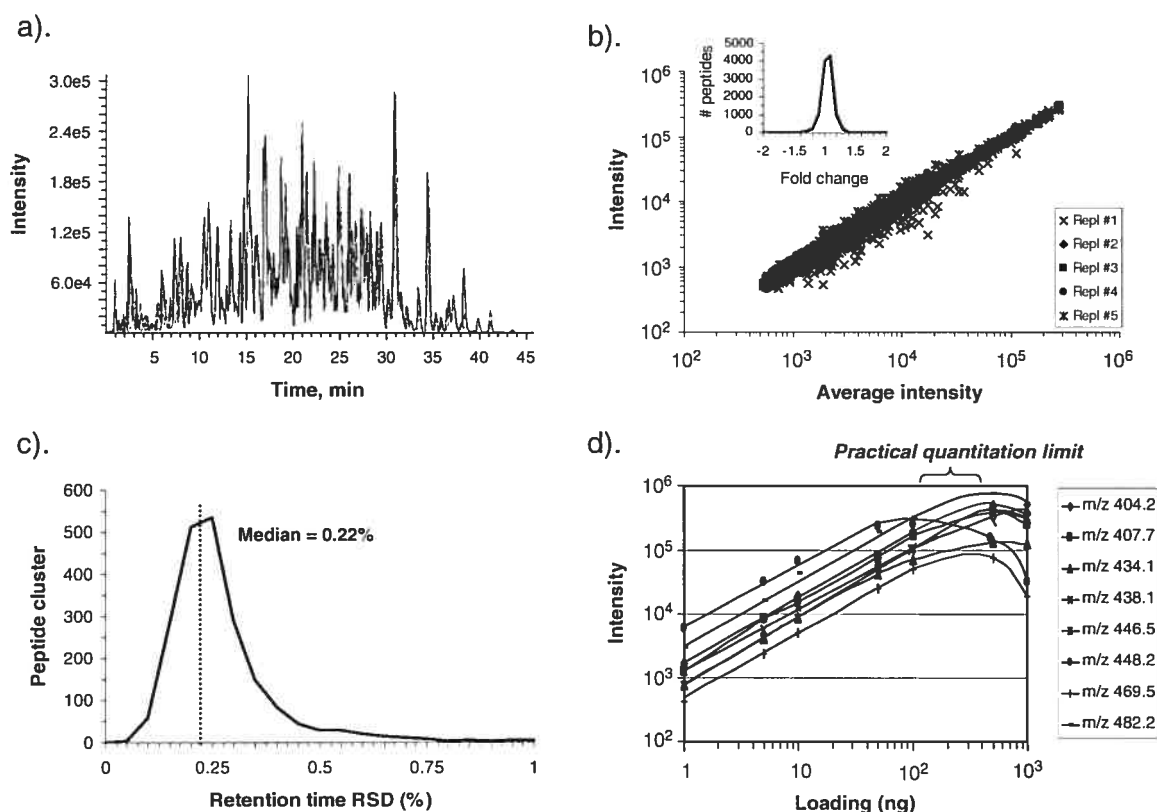


Figure 4.2 Nano LC-chip-MS of replicate injections ($n=5$) of an eight protein digest 250 fmoles each). a) Overlay of 5 total ion chromatograms for the corresponding analyses. b) Scatter plot of intensity measurements for 5 replicates and 2230 peptide ion clusters. c) Distribution of RSD values on retention time measurements. d) Variation of mass spectrometry response for different tryptic peptides according to sample amount loaded. Conditions: Enrichment/trap volume of 40 nL; LC separation channel of $43 \times 0.075 \times 0.050$ mm both packed with Zorbax C_{18} separation media; a 5 μ L inj of 80 ng tryptic digest of 8 proteins was performed except for d) where variable amounts (1-1000 ng) of digest were injected.

The observed peak width is directly influenced by the sample loading and the diffusion of eluting peptides. While the small dimensions of the present configuration

minimizes sample diffusion in transfer lines before and after the analytical column, peptide elution volumes are largely dictated by sample mass loading and zone broadening in the trapping and separation columns. For a fixed-mass injection that is below the sample overloading threshold, increased injection volume does not contribute significantly to peak broadening since the effective injection volume of the 40 nL trapping column rarely exceed 15 % of the average peak volume (171 nL). In contrast, sample mass loading was found to have more significant effect on peak broadening. An average peak width of 0.44 min with no significant shift in retention time could be maintained for sample loading up to 200 ng total digest mass. Beyond this point, peak broadening was accompanied with a gradual decrease in retention and displacement of more hydrophilic peptides. Similarly, peptide ion intensity showed a linear response up to sample loading of 200-400 ng (Figure 4.2d). Although larger sample-loading can be made on the present chip configuration, quantitative analyses relying on comparative ion abundance measurements are limited to approximately 200 ng, a maximum loading that was maintained in the present investigation. It is noteworthy that an extended dynamic range can be obtained using a trapping column of larger capacity, and a 160 nL precolumn has recently become commercially available. In the context of comparative proteome analyses, enhancement of sample loading can be achieved using multi-dimensional LC separation to resolve sample complexity into simpler fractions of convenient sample size. Alternatively, specific enrichment of target analytes from complex cellular extracts (e.g. phosphopeptides, glycopeptides, specific antigens) can be accomplished using affinity purification. Examples of these applications are presented in sections 4.4.2 and 4.4.3.

4.3.2 Comparative peptide detection and identification using two-dimensional chromatography (SCX/C₁₈) on a LC-Chip-MS System

The reproducible chromatographic and mass spectrometry performance of the present chip device, in terms of retention time, mass and intensity measurements, provides reliable operating conditions for comparative proteome analyses. However, the cellular complexity typically observed in a total cell lysate combined with the wide

dynamic range of protein abundance and corresponding expression changes often dictate the use of separation approaches providing larger peak capacity and sample loading compared to reversed phase LC-MS separation. In this context, we evaluated the analytical capabilities of the on-line two-dimensional separation (SCX/C₁₈) with the nano LC-chip-MS. Although SCX media could be packed into the microfluidic devices, the relative large volume requirements for convenient separation of μ g-sized protein digests would exceed the practical bed volume and configuration available of present chip design. Therefore, we incorporated an on-line SCX trap (8 cm x 0.5 i.d. mm) in the inlet port of the chip device. This SCX trap provides sample capacity exceeding 2 μ g of protein digest.

Complex proteome analysis was evaluated for the total cell lysate of human monocyte U937 cells, which provide a convenient cellular model system for differentiation studies [116]. The U937 cells were established from a diffuse histiocytic lymphoma displaying monocyte characteristics, which upon chemical stimulation with agents such as PMA can initiate cellular differentiation into macrophage-like cells.

In a preliminary study, we compared the reproducibility and peptide distribution across 8 salt fractions (0 to 2 M ammonium acetate, pH 3.5) for a protein extract of U937 control cells. Figure 4.3a compares the distribution of peptide clusters for individual salt fractions to that observed for the injection of the same sample on a one dimensional nano LC-Chip-MS system. A total of 2028 unique peptide clusters was obtained for the injection of 100 ng of protein digest for the C₁₈-only separation whereas 13,848 peptide clusters (a 6-fold increase) were detected for a 1.5 μ g injection on the combined SCX/C₁₈ separation. In addition to the increased sample loading capacity of SCX, its complementary separation mode enabled a partition of peptides according to their pI and charge state as illustrated in Figure 4.3a. For example, doubly-protonated peptides are predominantly observed in fractions 0 and 50 mM (74 and 78 % of total peptides,, respectively) and progressively decreased with increasing salt concentration (9 % of total peptides for 2 M fraction) whereas the number of pentuply-charged peptides is maximized at a salt concentration of 1 M (12 % of total peptides).

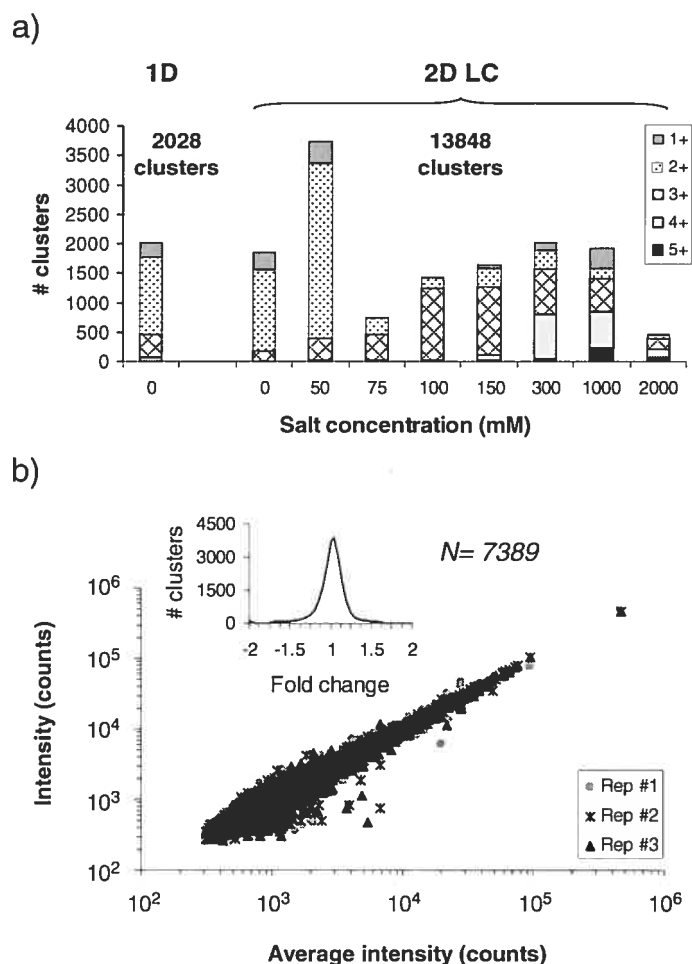


Figure 4.3 Comparison of peptide clusters detected using one- and two-dimensional LC separation using a nano LC-chip-MS system. a) Distribution of peptide ions according to charge and salt fractions. b) Scatter plot of intensity measurements for 3 replicates performed on the combined SCX/C18 nano LC-chip-MS system representing the intensity distribution of 7389 reproducibly detected peptide ion clusters. Conditions: Same as for Figure X2 except that a strong cation exchange column (SCX) (0.5 mm i.d. \times 8 cm) was connected directly to the switching valve and was on-line with the chip C₁₈ precolumn during sample loading, and toggled off-line during reversed-phase peptide separation on the analytical column. Peptides were sequentially eluted from the SCX column onto the C₁₈ precolumn with 8 salt fractions of ammonium acetate (0, 50, 75, 100, 150, 300, 1000, 2000 mM, pH 3.5). Injection of 100 ng and 1.5 μ g of protein digest from control U937 cells were injected on the one- and two-dimensional LC systems, respectively.

The reproducibility of the SCX/C₁₈ nanoLC-chip-MS system was evaluated for replicate injections of 1.5 µg (n=3) made over a three-day period. Clustering analyses were performed for three replicates to identify unique peptides in all salt fractions. Close examination of these results, indicated that a total of 8055, 4246 and 7389 unique peptide clusters were observed across all fractions in 1, 2 and 3 replicates, respectively. Evaluation of unique peptide distribution along contiguous salt fractions revealed a relatively low frequency of spreading. Peptide clusters were observed over a maximum of three salt fractions with an intensity-weighted median value of 1.2 fractions, consistent with previous observations with capillary LC columns [146]. The scatter plot of intensity distribution for unique cluster peptides found in all three replicate injections is shown in Figure 4.3b. As indicated, good reproducibility was obtained across all replicate injections with 95 % of all detected clusters showing less than 40 % variation in intensity (inset, Figure 4.3b).

The reproducibility of the present two-dimensional nanoLC-chip-MS approach thus provided a meaningful method to detect statistically relevant changes in expression profiles of peptide ions (protein surrogates) across different sample sets. In this context, we compared the changes in the proteome of human monoblastic cell line U937 following PMA treatment. U937 monoblast cells were split in two after 3 days of culture to yield control and PMA-exposed (150 nM PMA, 1h) cell extracts. Following cytosol protein extraction, reduction/alkylation and BCA quantitation, extracts were digested with Lys C/trypsin and 1.5 µg of the corresponding digests were injected on the two-dimensional nano LC-chip-MS system. The injection of control and PMA-treated protein digests (n=3) were interleaved such that all 8 salt fractions of a given control replicate were analyzed before applying the corresponding PMA replicate sample.

A comparison of all peptide cluster ions detected in at least two replicates for control and PMA-treated samples is shown in Figure 4.4. A total of 16329 unique peptide clusters were found across all salt fractions and samples, of which 9756 peptide ions were observed in two or more sample replicates. The scatter plot of the corresponding peptide clusters (Figure 4.4a) shows the intensity distribution of cluster ions found across these two protein extracts.

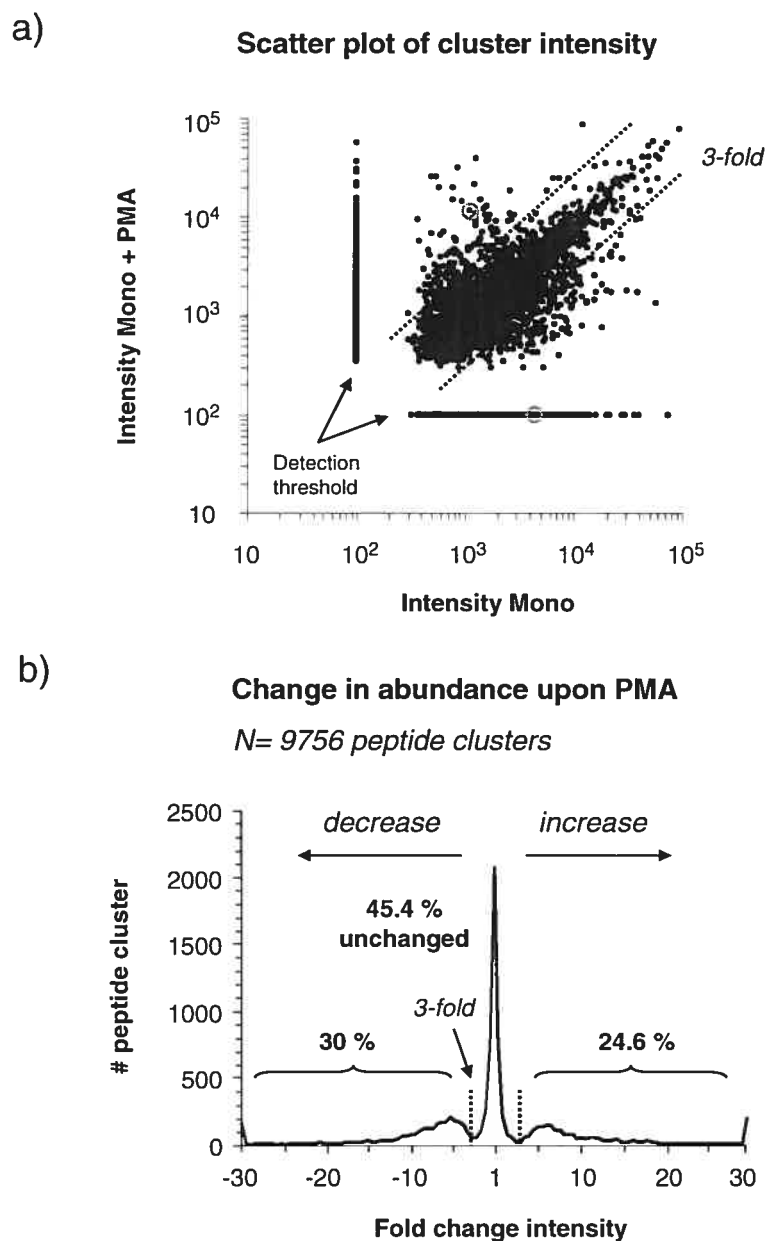


Figure 4.4 Distribution of peptide cluster intensities for control and PMA-treated U937 cells ($n=3$). a) Scatter plot of ion intensity for peptide clusters reproducibly detected in at least 2 replicates. The dotted line shows the 3-fold change in abundance. b) Expression plot showing the number of down-regulated (30.0 %), up-regulated (24.6 %) and unaffected (45.6 %) peptide clusters from a total of 9756 peptide clusters. Conditions: As for Figure 3 for SCX/ C_{18} separation. Replicate injections of 1.5 μg of protein digest from control and PMA-treated U937 cells were injected on two-dimensional nano LC-chip-MS systems.

The average relative standard deviation for peptide clusters found in all three replicates of either control or PMA-treated samples ($n=6394$ peptide clusters) varied from 12 % at 300 counts and progressively decreased to 6 % for ion intensities of 100,000 counts. For convenience, the dotted line in Figure 4.4a delimits a 3-fold boundary representing a statistically meaningful change in abundance for the corresponding peptide clusters. The expression plot of ion intensity (Figure 4.4b) indicates that 45.4 % of observed peptide clusters showed intensity variation within 3-fold across all three replicates suggesting minimal protein expression change upon PMA exposure. In contrast, 30.0 % and 24.6 % of reproducibly detected peptide clusters showed more than 3-fold decrease and increase in abundance upon PMA treatment, respectively. In order to determine the identification of peptide clusters the chip interface was transferred on an Agilent ion trap XCT mass spectrometer and the same samples were re-injected ($n=3$). Results from peptide identification analyses were correlated with the corresponding cluster ions by aligning the retention times and peptide masses found across the different salt fractions using an in-house clustering program. Comprehensive database searches revealed that 196 unique protein entries were identified with average sequence coverage of 22 %. Table 4.1 shows examples of proteins with at least two identified peptides for each. For convenience, the sequence coverage, the peptide identity and the average fold change of each protein is also presented in Table 4.1. As indicated, proteins such as HSP84, HSP71, GAPDH and tubulin which were identified with at least 5 different peptides did not show significant change in expression levels (<3 average fold change) upon PMA treatment consistent with earlier reports [113, 147-149]. In contrast, proteins such as globular-actin, and T-complex protein-1 (TCP-1) were down-regulated. TCP-1 proteins are molecular chaperones assisting the folding of newly synthesized cytoskeletal proteins such as α -, β -, γ -tubulins, actin, and centractin [150, 151]. A concurrent decrease in expression of G-actin and TCP-1 in response to PMA or lipopolysaccharides (LPS) was previously reported [147, 152], and possibly suggests a growth reduction and changes in cell morphology and motility [153].

Table 4.1 Partial list of identified proteins showing differential expression upon PMA treatment.

Protein	Mass (kDa)	Fold change *	Sequence coverage	Peptides	Ref.
TCP-1	57.8	-12.5	3.6	GIDPFSLDALSK HTLTQIK	143
G-Actin	41.6	-5.0	9.4	DLTDYLMK GYSFTTTAER YPIEHGIITNWDDMEK	148
β -Tubulin	49.7	-2.6	17.8	LHFFMPGFAPLTSR FPGQLNADLR SGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAK IMNTFSVVPSPK ALTVPELTQQMFDK	143
HSP84	83.2	-1.3	10.1	APFDLFENKK APFDLFENK SIYYITGESK IDIIPNPQER YHTSQSGDEMTSLSEYVSR NPDDITQEEYGEFYK	109
HSP71	69.3	-1.1	12.6	NALESYAFNMK TWNPSVQQDIK HWPQVINDGDKPK NQVAMNPTNTVFDK HWPFMVVNDAGRPK MVNHFAEFK	144
GAPDH	44.5	1.1	20.9	LVINGNPITIFQER VIISAPSADAPMFVMGVNHEK LISWYDNEFGYSNR VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK VGVNGFGR	145
HSP90- α	84.5	1.1 -43.7	5.1	KHLEINPDHSIETLR ESEDKPEIEDVGpSDEEEKK	151, 153
Tropo- myosin	28.8	3.8	10.4	IQLVEEELDRAQER EQAEAEVASLNR	144
Vimentin	53.5	6.7	23.6	FANYIDK KVESLQEEIAFLK VEVERDNLAEDIMR ILLAELEQLK LGDLYEEEMR EEAENTLQSFR ISLPLPNFSSLNLR ETNLDLPLVDTHSK DGQVINETSQHDDLE	150
α -Enolase	47	9.0	22.1	LAQANGWGMVSHR IGAENVYHNLK SFIKDYPVVSIEDPFDQDDWGAWQK YDLDFK AAVPSGASTGIYEALER LAMQEFMILPVGAANFR	144, 148

*Average fold change determined from all identified peptides

Significant up-regulation in expression was observed for a number of proteins including tropomyosin 3, α -enolase and vimentin (Table 4.1, Figure 4.5).

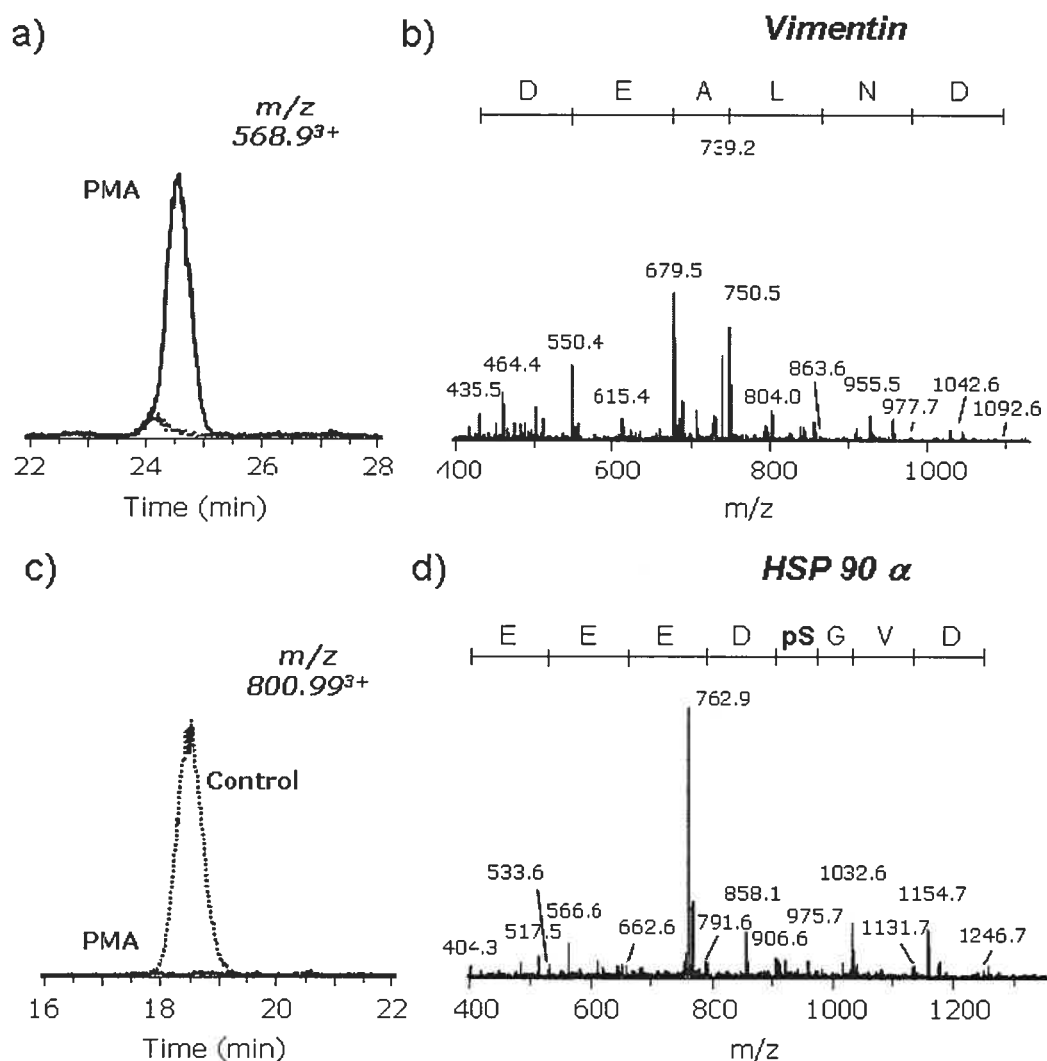


Figure 4.5 Identification of proteins showing differential expression upon PMA treatment.

Reconstructed ion chromatograms of (a) m/z 568.9³⁺ and (c) 800.99³⁺ showing differential abundance in control and PMA exposed cells. Dotted lines correspond to control digests and solid lines to PMA-treated samples. MS-MS spectra of precursor ions m/z 568.9³⁺ and 800.99³⁺ circled on the scatter plot of Figure 4.4a. MS-MS spectra of (b) m/z 568.9³⁺ and (d) 800.99³⁺ confirming identification of vimentin and HSP90- α , respectively. The Ser₂₆₂ phosphorylation site of HSP90- α is shown in (d). Conditions as for Figure 4.4.

Consistent expression measurements were observed from comparative ion profile measurements as indicated for vimentin peptide ions which all showed expression change of at least 6-fold upon PMA treatment. Figure 4.5a shows the reconstructed ion chromatograms for the triply-protonated tryptic peptide m/z 568.9 representing an increase of 10-fold in ion intensity upon PMA treatment (circled in Figure 4.4a). The identity of this peptide was confirmed from its MS-MS spectrum which showed abundant sequence-specific ion series corresponding to b- and y-type fragment ions (Figure 4.5b). While α -enolase is an essential glycolytic enzyme involved in cell metabolism, tropomyosin and vimentin are implicated in stabilizing actin filaments and their up-regulation during differentiation and maturation is consistent with the rapid structural changes in size and morphology of monocytes to adopt macrophage-like functional attributes [148, 154]. The comparison of ion profiles for peptides obtained from the same proteins also revealed subtle structural changes taking place during cell differentiation. For example, HSP90- α was identified by two peptides: KHLEINPDHSIIETLR and ESEDKPEIEDVGSDEEEEEKK (Table 4.1). The ion profile ratio of the first peptide was 1.1, suggesting no significant protein expression change, consistent with previous report [155]. Intensity measurements obtained on the second peptide showed more than 45-fold decrease in abundance upon PMA treatment (Figure 4.5c). The intensity of this peptide was below the detection of the nano LC-chip-system set to 100 counts (circled in Figure 4.4a). Closer inspection of the MS-MS spectrum of the corresponding tryptic peptide confirmed its phosphorylation at residue Ser₂₆₂ (Figure 4.5d). Interestingly, HSP90- α can be phosphorylated at Ser₂₃₁ and Ser₂₆₂ by casein kinase II *in vitro* [156]. A recent report indicated that HSP90- α strongly associates with IKK- γ (IKK- γ) possibly contributing to its stabilization, activation and/or shuttling IKKs to the plasma membrane, and that this interaction is dramatically reduced following exposure to PMA [157]. While the expression levels of HSP90- α appeared constant upon PMA stimulation, the rapid change of Ser₂₉₂ phosphorylation suggests that its interaction with IKK- γ could be mediated by phosphorylation.

The comparison of protein expression and phosphoproteome profiles thus provide valuable information to probe transient protein interactions that are modulated through signaling events. Obviously, such comparison relies on the meaningful

identification of phosphoproteins and their phosphorylation sites, and section 4.4.3 examines a phosphopeptide enrichment strategy based on TiO_2 beads to identify trace-level phosphoproteins and their corresponding changes in expression following PMA treatment.

4.3.3 Selective enrichment of phosphopeptides using TiO_2 and differential phosphoproteome analyses of U937 monocyte cells following the administration of phorbol ester

Comprehensive phosphoproteome analysis represents a significant analytical challenge in view of the low abundance of phosphoproteins within cell extracts and the instrumental requirements to achieve meaningful identification. Indeed, in human cells it is estimated that approximately one third of all proteins can be phosphorylated at any one time by a subset of 575 different protein kinases [158, 159]. Protein phosphorylation primarily takes place on serine and threonine residues and less frequently on tyrosine amino acids (the ratio pSer:pThr:pTyr in vertebrate cells is 1800:200:1) [160]. Furthermore, the phosphorylation stoichiometry or site occupancy is relatively low and the dynamic range of protein phosphorylation can span over more than 3 orders of magnitude of abundance often exceeding the detection range of most sensitive analytical instruments. More importantly, phosphorylated residues represent < 1% of the whole protein sequence and the isolation of peptide segments comprising these modifications requires further fractionation and enrichment.

Recent reviews have compared their respective merits and limitations of different phosphopeptide enrichment approaches including immunoaffinity precipitation, immobilized metal affinity chromatography (IMAC), and targeted chemical labeling through β -elimination/Michael's addition [160-163]. For practical reasons, the selection of the most appropriate enrichment method is often guided by the sample availability, the recovery yield, the extent of side reaction products and the inherent complexity arising from the sample preparation. Enrichment approaches involving less sample manipulation steps are generally preferred to maximize recovery, and previous reports from our group and others described the use of IMAC for the isolation of

phosphopeptides [144, 126-128]. More recently, the availability of selective enrichment media such as TiO_2 and ZrO_2 have been introduced and hold significant promise for reliable and reproducible enrichment of phosphopeptides from complex cell extracts [164, 165]. As part of this study, we evaluated the analytical potential of the TiO_2 enrichment approach and compared the phosphopeptide expression profiles of U937 treated with or without PMA using the nanoLC-chip-MS system.

Preliminary experiments on TiO_2 enrichment media were first performed to compare the recovery yields and detection limits of phosphopeptides with increasing amounts of α -casein tryptic digests spiked into complex protein digests. These experiments indicated that unambiguous identification of phosphopeptides present at levels of 25 fmols in 250 μg of protein digest was successfully achieved with good linear dynamic response ($r^2 > 0.98$) over the concentration range of 25 fmols-2.0 pmoles of α -casein (data not shown). It is noteworthy that phosphopeptides present in the original cell extract remained constant across all spiked samples examined.

Similarly to that described in section 4.4.2, we evaluated the capability of the nano LC-chip-MS system to monitor changes in the phosphoproteome of U937 cells following chemical stimulation with PMA and enrichment with TiO_2 media. Reduced and alkylated protein extracts from U937 monoblastic cells exposed or not to 150 nM PMA were digested with trypsin and 250 μg of the corresponding digests were subjected to TiO_2 isolation. Enriched phosphopeptide samples were then analyzed in triplicate on the nano LC-chip-TOF system. On average, a total of approximately 2500 peptide ions were detected in each analysis out of which 1791 peptide clusters were reproducibly observed in at least 2 replicates. Figure 4.6a shows a representation of the ion intensity distribution for reproducibly detected peptide clusters in both control and PMA-treated cells. For convenience, the dotted lines shown in Figure 4.6a represent a three-fold average standard deviation ($3 \times \text{Stdev}$) on ion intensity of peptide clusters and delimit the boundary of statistically relevant change in expression across the intensity domain. Accordingly, a total of 1467 peptide clusters (82 % of all reproducibly detected clusters) did not show significant change in abundance upon PMA treatment. These ions were unaffected and exhibited less than 3-fold change across 2.5 orders of magnitude in intensity with a normal distribution centered on unity.

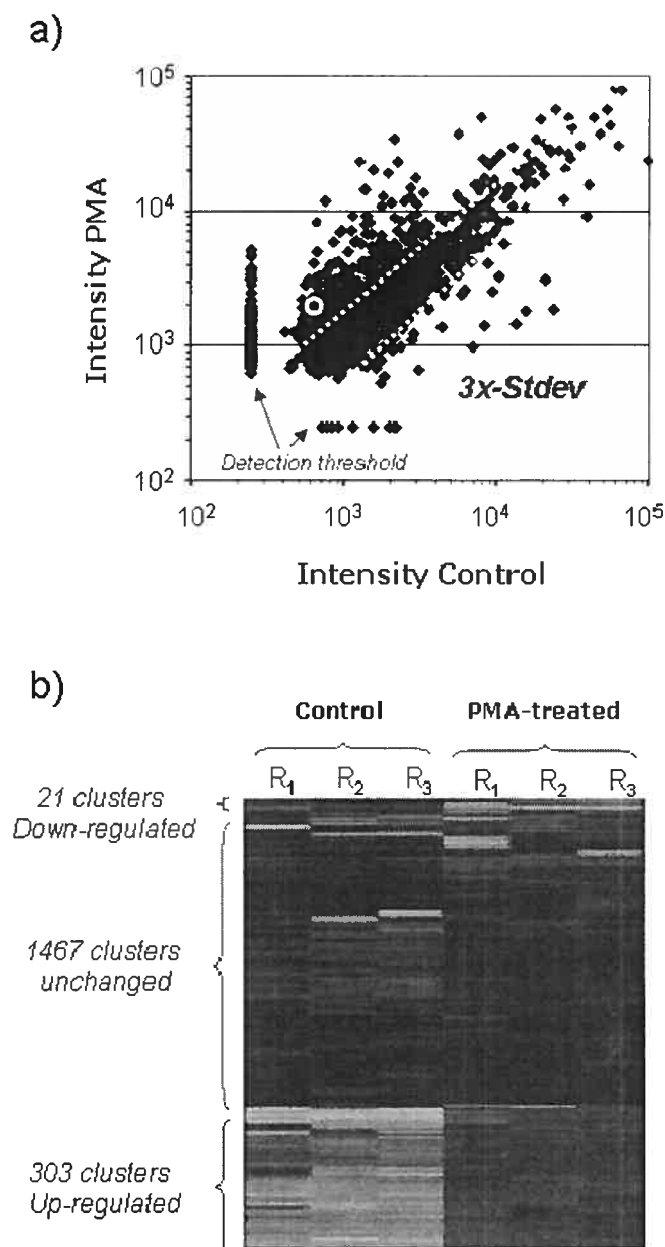


Figure 4.6 Differential phosphoproteome analysis of U937 cells following PMA challenge and TiO_2 isolation. a) Scatter plot ion intensity for peptide clusters reproducibly detected in at least 2 replicates ($n=1791$ peptide clusters). The dotted lines represent the delimitation of ion abundance showing ± 3 -fold change in standard deviation. b) Clustergram of intensity distribution for 1791 peptide clusters in control and PMA exposed samples. Conditions: As for Figure 4.2. An aliquot (50 %) of TiO_2 -enriched phosphopeptides from U937 protein digests (250 μg) corresponding to approximately 150 ng injection was injected on the nano LC-chip-MS system.

The intensity distribution of the corresponding peptide clusters is represented in the central portion of the clustergram of Figure 4.6b which regroup replicate clusters according to a logarithmic gray-scale with intensity values transitioning from white to black to indicate ions of increasing intensity. Significant changes in expression were observed in both up-regulation (303 peptide clusters, 17 % of total) and down-regulation (21 peptide clusters, 1 % of total) for ion clusters distributed outside of the dotted line boundaries. It is noteworthy that this trend is somewhat different than that observed for U937 protein extracts not subjected to TiO₂ enrichment (24.6 % up-regulated, 30.0 % down-regulated and 45.4 % unaffected, Figure 4.4b) suggesting that variations in phosphoproteome are distinct from those of overall protein expression changes. This observation is not entirely unexpected as previously described in section 4.4.2 for HSP90- α . Obviously, such changes in differential phosphorylation must consider variations in actual protein abundance in order to determine whether or not the increase in kinase activity for given substrates are independently regulated from their synthesis or translocation. For challenge experiments taking place under a short time duration (< 2 hr), the changes in protein abundance due to newly synthesized proteins are minimized.

Following expression analyses, nano LC-chip-MS-MS experiments were performed on an ion trap mass spectrometer to identify suspected phosphoproteins showing up- and down-regulation upon PMA treatment. Examples of data obtained are illustrated in Figure 4.7 for two peptide clusters circled on the scatter plot of Figure 4.6a. The reconstructed ion chromatogram for m/z 851.8²⁺ (Figure 4.7a) shows a consistent up-regulation by at least 3-fold in the PMA-treated cells. Tandem mass spectrometry analyses of the corresponding doubly-charged peptide ion (Figure 4.7b) provided a partial sequence assignment for AAAAAPEAGApS which upon data search using Mascot was identified to Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARKS). MS-MS spectrum of the corresponding ion showed a fragment at m/z 472.2 and a weak loss of 98 Da from m/z 639.3 consistent with a phosphorylated Ser₁₀₀ residue.

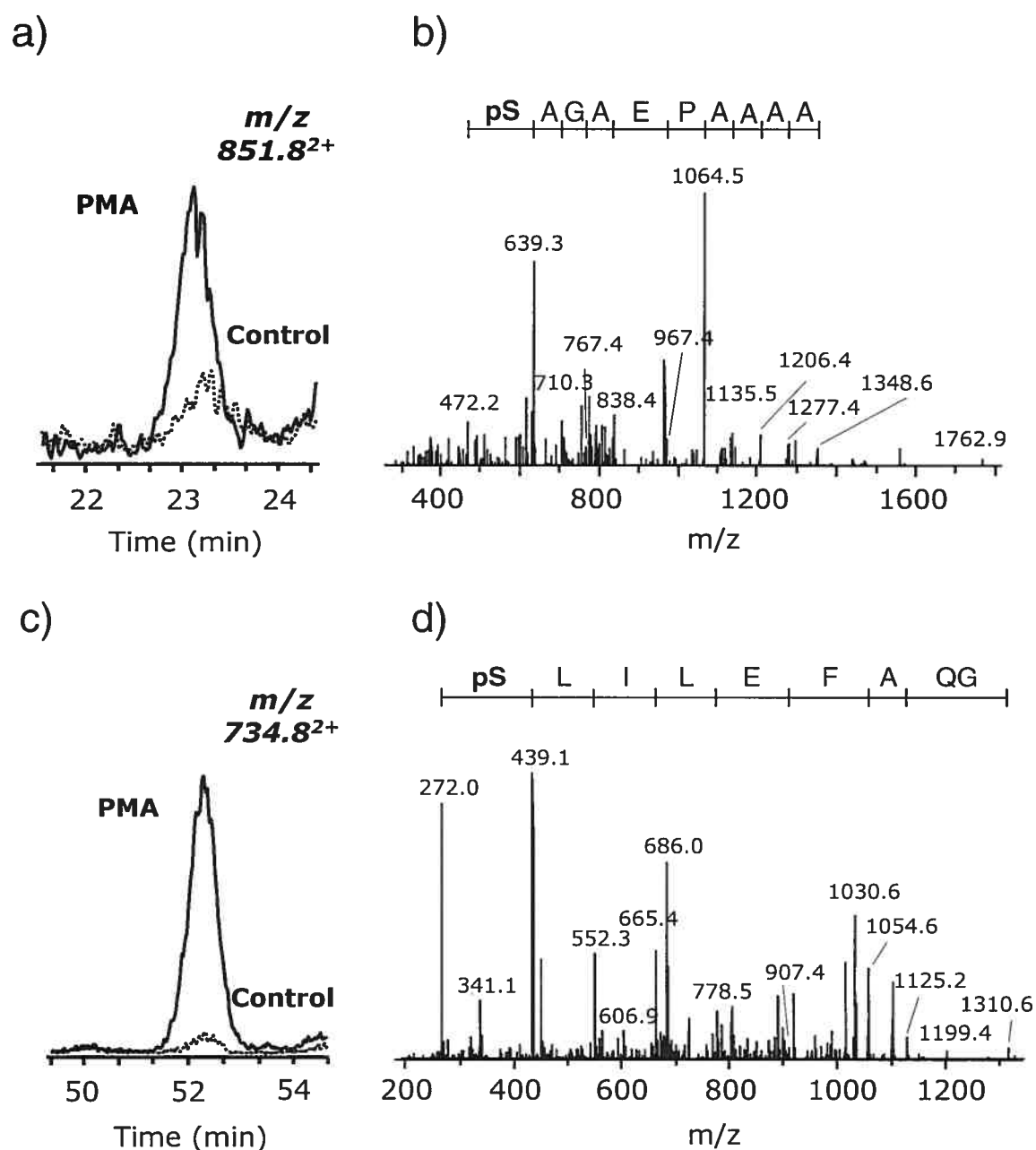


Figure 4.7 Identification of differentially expressed phosphoproteins from U937 cells following PMA administration. Reconstructed ion chromatograms of (a) m/z 851.8²⁺ and (c) 734.8²⁺ circled on Figure 4.6a and showing increased abundance upon PMA treatment. MS-MS spectra of (b) m/z 851.8²⁺ and (d) m/z 734.8²⁺ confirming the protein identification and the site of phosphorylation. Conditions as for Figure 4.6.

Phosphorylation of this residue was not reported previously but showed homology to a cyclin-dependent kinase (CDK) motif. Interestingly, MARKS binds to calmodulin, actin, and synapsin and is a cellular substrate for protein kinase C (PKC). Also, this protein becomes significantly phosphorylated upon PMA treatment [166]. Sites of PKC phosphorylation on MARKS could not be confirmed by the present MS-MS experiments as the resulting tryptic peptides located in a highly basic region between residues 151-164 were too small or too hydrophilic to be detected efficiently.

Another example of differential phosphorylation is shown in Figures 4.7c and 4.7d for the doubly-protonated tryptic peptide m/z 734.8 showing more than 6-fold change in abundance upon PMA. The MS-MS spectrum of this precursor ion (Figure 4.7b) enabled the identification of stathmin based on the partial sequence GQAFE LILpS. The location of the modified residue was assigned to Ser₂₄, based on the observation of a fragment at m/z 272.1 and a loss of 98 Da from m/z 439.1. A previous report has indicated that this residue can be phosphorylated by CDK1 and MAPK [167]. Stathmin is implicated in the regulation of microtubule stability and dynamics, and PMA induces its phosphorylation and stimulates membrane ruffling and cell motility. Phosphorylation regulates the spatial distribution of stathmin-tubulin interaction within cells and a stathmin phosphorylation gradient is necessary for correct spindle formation in mitotic cells [168]. Other important mediators of cellular transformation and organization including L-plastin, HSP90, c-Myc-responsive protein Rcl, microfibrillar-associated protein 1, ras-GTPase-activating protein binding protein 1, 14-3-3, and Src substrate cortactin were also identified as part of this study and highlight the analytical capabilities of the nano LC-chip-MS systems for expression and identification measurements.

Table 4.2 summarizes the protein identification obtained for the U937 differentiated cells. A database search performed on the acquired MS-MS spectra revealed a total of more than 106 unique protein clusters, among which approximately 80 % corresponded to phosphoproteins. It is noteworthy that comparable analyses performed by our group on similar protein extracts from U937 using IMAC (Ga³⁺) isolation provided an enrichment level of approximately 25 % [144], and the use of TiO₂ provided a marked advantage for phosphoproteomics studies.

Table 4.2: Summary of phosphoproteome analysis obtained on U937 differentiated cells

Sample type (TCL)	Average# detected peptide ions	#Protein clusters identified	#Phosphoprotein clusters (peptide sequences)
Monocyte	1513	64	49 (93: 91pS 10pT 2pY)
Monocyte + PMA	1466	77	67 (120: 99pS 19pT 3pY)

Furthermore, the TiO₂ enrichment media enabled the identification of several phosphorylation sites from the same proteins and almost 2 phosphosites/unique phosphoprotein clusters were identified on average. For example, phosphoproteome analyses performed on 250 µg of U937 cells treated with PMA enabled the identification of 67 unique phosphoprotein clusters corresponding to 120 different phosphopeptides. These peptides showed the expected distribution of phosphorylated residues favoring Ser and Thr residues with significantly lower proportion of phosphorylated Tyr residues. Our study enabled the identification of 152pS 25pT 4pY sites on phosphopeptides, more than 40 % of which were unreported in the literature. Altogether these data provided valuable biological insights to probe the subtle change in cellular phosphoproteome arising from environmental stimulation.

4.4 Conclusion

A microfluidic device integrating an enrichment trap, a separation column and a nanoelectrospray emitter offers a convenient protein expression and identification platform for proteomics discovery programs. The modularity, ease of use, reproducibility and ruggedness conferred by these devices facilitate the identification of differentially abundant proteins from cell model systems or biomarker studies. The present system provides good reproducibility in terms of retention time, m/z and intensity measurements for both one and two-dimensional nanoLC separations. Indeed, peak measurements taken on more than 2200 different peptide clusters from replicate injections (n=5) of an 8-protein standard provided RSD values of less than 0.5 %, 0.003 % and 10 % for retention time, m/z , and intensity, respectively. A linear dynamic

response of ion intensity was maintained over more than 3 orders of magnitude for sample loading up to 200 ng using a 40 nL enrichment trap and a separation column of 4.3 cm length (75 x 50 μ m channel).

Improvement of sample loading up to 2 μ g was achieved by combining an SCX trapping column prior to the C_{18} chip device. The application of the combined SCX/ C_{18} was evaluated for the analysis of complex protein extracts of U937 human monocytic cells, and good reproducibility was obtained across all replicate injections over a three-days period with 95 % of all reproducibly detected clusters ($n=7389$) showing less than 40 % variation in intensity. The remarkable sensitivity and reproducibility of the present system enabled the identification of proteins such as TCP-1, G-actin, tropomyosin, vimentin, all showing relevant changes in abundance upon PMA administration, consistent with the rapid size and morphology changes expected during the transformation of monocytes into macrophage-like cells.

More detailed profiling of signal-induced changes of U937 cells was achieved by comparing the phosphoproteome of protein extracts obtained from control and PMA-exposed cells following TiO_2 -enrichment and nano LC-chip MS analyses. Expression profiling of enriched phosphopeptide extracts revealed a subset of 17 % of the entire population that showed a reproducible increase in abundance upon PMA exposure. Among these were phosphopeptides from MARKS, stathmin, L-plastin, HSP90, c-Myc-responsive protein Rcl, microfibrillar-associated protein 1, ras-GTPase-activating protein binding protein 1, 14-3-3, and Src substrate cortactin, all representing important mediators of cellular transformation and organization. These analyses also enabled the identification of 106 protein clusters with approximately 2 phosphosites/unique phosphoprotein clusters on average. Differential phosphoproteome analyses from 250 μ g protein extract from U937 cells identified 152pS 25pT 4pY sites on phosphopeptides of which approximately 40 % were unknown. The approach described here represents a meaningful analytical strategy to profile and identify important cellular markers of the U937 phosphoproteome using relatively modest protein amounts. More importantly, this approach is anticipated to be of practical use in cancer research programs to compare the phosphorylation signatures associated to normal and cancerous cells.

The capability to profile complex data sets with sensitivity, reproducibility and comprehensiveness using microfluidic devices coupled to nanoelectrospray mass spectrometry open new horizons for proteomics research. Indeed, the ability to conduct expression profiling of unlabeled protein digests and to identify important markers of cellular changes is of significant interest to mass spectrometry-based proteomics platforms involved in biomarker studies, drug discovery and cancer research programs. Although the field of microfluidic-mass spectrometry is still in its infancy, advances made in the automation, the reproducibility and the versatility of these systems will accelerate their acceptance as meaningful discovery tools that can be used by non-experts.

Acknowledgements

We thank Agilent Technologies for providing early access to the prototype nano LC-chip-MS system, and MSD ion trap XCT mass spectrometer. We are also grateful to Agilent staff members Georges Gauthier for valuable discussion and support, Debbie Ritchey and Reid Brennan, Linda Cote and Sebastien Marchand for technical support. Finally, we acknowledge G. Jaitly (IRIC) and N. Jaitly (PNNL) for invaluable assistance with the peptide detection and clustering algorithms.

**5. L'application du système microfluidique intégré
pour la séparation des protéines provenant d'extraits
cellulaires complexes**

5.1 Introduction

En protéomique, l'étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles (PTM) permet une description dynamique de la régulation de l'expression des gènes. La position et la nature des PTM jouent un rôle important dans la régulation de l'activité biologique des beaucoup de protéines [169-171]. Pour l'analyse des protéines et leurs PTM par HPLC-ESI/MS on utilise deux approches fondamentales. La première approche, la plus souvent employée en spectrométrie de masse, est connue sur le nom "bottom-up". Dans ce cas, les protéines sont digérées à l'aide des enzymes et les peptides sont séparés par chromatographie liquide (RP-LC) suivie d'une détection par spectrométrie de masse. Les peptides générés lors de la digestion par une enzyme spécifique représentent une signature unique de la protéine de départ. De nos jours, plusieurs bases de données regroupent une telle information pour des protéines connues. L'identification des protéines par ce qu'on appelle "peptide mass fingerprinting" repose sur ce principe [172, 173]. Les masses des peptides obtenues par LC-MS sont comparées à celle d'une base de données et sont ensuite comparées aux entrées existantes. Une autre méthode d'identification comprenant les masses théoriques des protéines répertoriées. Dans ce cas, les ions peptidiques subissent une fragmentation qui permet de retracer la séquence du peptide de départ. Les séquences ainsi générées sont ensuite comparées à celles déjà existantes dans des bases de données et permettent l'identification des protéines initiales [174-176]. La méthode "peptide mass fingerprinting" est possible pour des mélanges protéiques simples (< 3 protéines). La méthode par MS en tandem permet d'analyser des mélanges complexes des protéines et s'applique bien aux analyses de type protéomique.

La deuxième approche, connue sous le nom "top-down", consiste à séparer des protéines intactes par RP-LC et ensuite à fragmenter les ions moléculaires multiplement chargés dans le spectromètre de masse [177-181]. Cette méthode permet d'obtenir une couverture de 100% de la séquence des protéines analysées [178]. De plus, avec une méthode d'activation-dissociation par capture électronique dissociative (ECD) employée en spectrométrie de masse à transformée de Fourier elle se montre particulièrement puissante lors de la caractérisation des PTM labiles [182]. Par

comparaison, l'approche "bottom-up" permet généralement d'obtenir environ 60% de couverture de la séquence des protéines et est en quelque sorte limitée dans l'habilité d'identifier les PTM.

Dans les chapitres antérieurs, en employant l'approche "bottom-up", nous avons montré que le système microfluidique intégré puce nano-HPLC présente des avantages significatifs pour l'analyse des mélanges complexes de protéines digérées dont une haute sensibilité, efficacité et reproductibilité ainsi qu'une réduction de la quantité d'échantillon requis. Dans le contexte de la recherche protéomique, ces avantages facilitent le suivi des modifications d'expression des protéines ainsi que les PTM. Les analyses présentées dans ce chapitre veulent élargir les applications de la puce nano-HPLC dans le contexte de la protéomique "top-down". À cette fin, nous avons évalué le système microfluidique pour la séparation des protéines intactes (particulièrement des histones) et leurs PTM dans des extraits cellulaires complexes.

Chez les eucaryotes, l'information génétique s'organise dans une structure nucléoprotéique, appelée chromatine (figure 5.1a) [183]. Au niveau moléculaire, l'unité élémentaire de chromatine est le nucléosome. Ce dernier comporte un octamère protéique comprenant deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 [184]. Les nucléosomes sont liés ensemble par le lieur d'ADN et l'histone H1 pour former la chromatine (figure 5.1b) [183]. Les histones sont régulées par des PTM sur les queues N-terminal et C-terminal de ces protéines (figure 5.1c) [185]. Il a été prouvé que l'habilité de séparation et d'identification des PTM (l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation) a une grande importance afin de corrélérer les modifications structurales des histones et leurs effets sur les mécanismes de régulation de chromatine [186, 187]. En particulier, l'acétylation des histones est une modification covalente très spécifique qui produit différentes formes ayant des rôles fonctionnels distincts, et qui en général est corrélée avec l'état actif ou passif de la chromatine par rapport à la transcription [188]. Dans l'état hypo acétylé, les nucléosomes sont très compacts suite à l'interaction ionique entre les groupes amino primaires protonés des lysines et les groupes phosphates des nucléotides ADN. Dans ce cas l'accès des facteurs de transcription à l'ADN cible est restreint et la transcription est empêchée. Par contre, l'acétylation des histones permet de

relaxer les structures des nucléosomes est la chromatine devient accessible à la transcription [189].

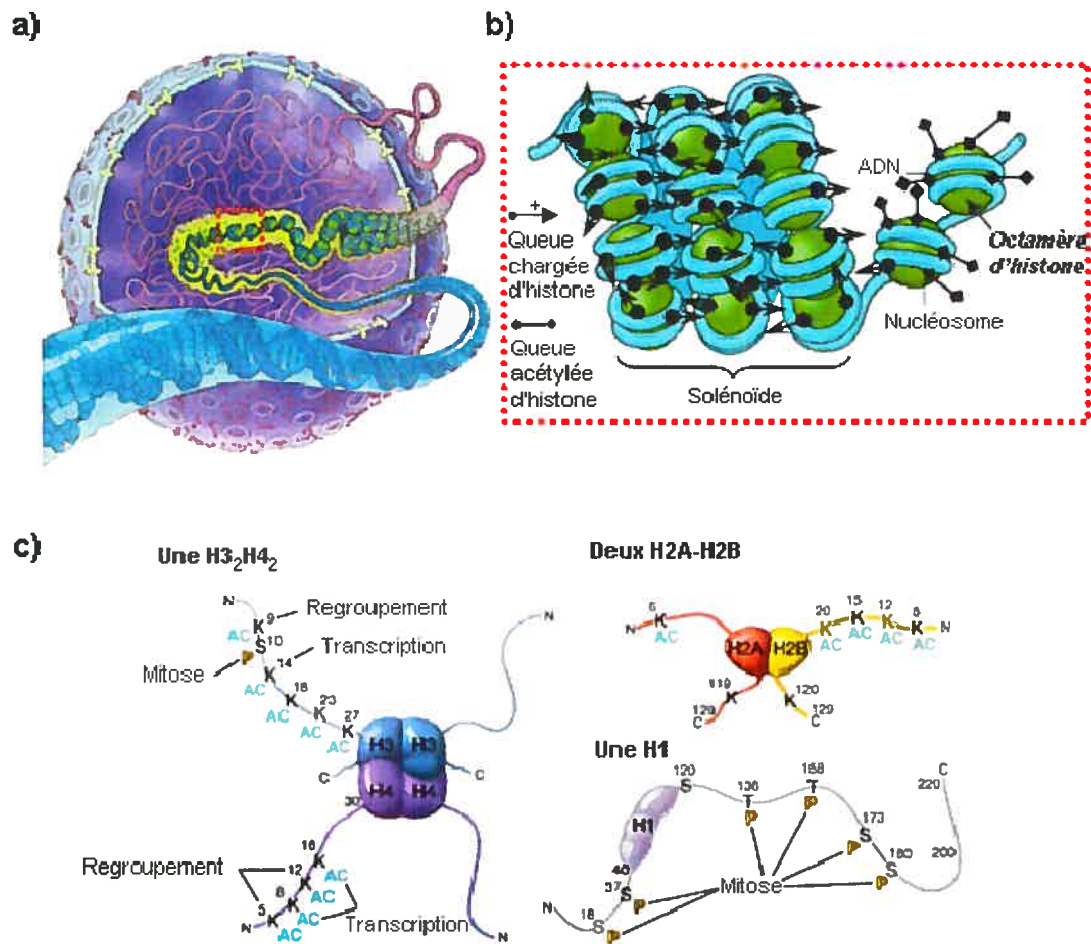


Figure 5.1 Structure de la chromatine. (a) Chaîne de la chromatine dans le noyau. (b) Structure hélicoïdale de la chromatine repliée. (c) Présence de PTM sur les domaines N-terminal et C-terminal des histones impliquées lors de différentes fonctions cellulaires; AC - acétylation des lysines (K), P – phosphorylation, S - sérine, T – thréonine, reproduit de [183, 185].

En utilisant la ligne cellulaire NIH/3T3 traité ou non avec du trichostatin A (TSA), Hirschelr-Laszkiewicz et al. [190] ont trouvé une augmentation des associations entre le ADNr et la forme acétylée de l'histone H4. Ils ont aussi suggéré que l'acétylation peut affecter aussi la transcription de ADNr de façon directe par

l'acétylation des histones et indirecte par les PTM du facteur de transcription UBF. Donc, l'objectif de ce chapitre est d'élargir les applications de la puce nano-HPLC dans le contexte de la recherche protéomique, pour les profils d'expression des protéines (histones) et pour l'identification de leurs PTM correspondantes.

5.2 Matériels et méthodes

5.2.1 Matériels

Les solvants utilisés ont été tous de pureté HPLC ou supérieure. L'eau, l'acetonitrile (ACN) et le méthanol, ont été achetés de la compagnie Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). L'acide formique (FA) a été obtenue de la compagnie EM Science (Mississauga, ON, Canada). L'acide trifluoroacétique (TFA) et l'anhydride propionique ont été achetés de SIGMA (St Louis, MO, É-U). L'acide chlorhydrique (HCl) et l'acétone ont été procurés d'EMD Biosciences (Gibbstown, NJ, É-U). La trypsine a été obtenue de Promega (Madison, WI, É-U). Les lignes cellulaires NIH/3T3 (fibroblaste de souris) et U937 (monocyte humain, cellules hystiocytiques de lymphome) ont été obtenues de la compagnie ATCC (Manassas, VA, É-U).

5.2.2 Préparation des échantillons

Les lignées cellulaires U937 et NIH/3T3 ont été cultivées jusqu'à une densité de 1 million cellules/mL, en RPMI-1640 (Hyclone, Logan, Utah) et IMDM (Gibco-BRL, Grand Island, NY) respectivement, et 10% sérum foetal de bovin (FBS) supplémenté avec 1% Peniciline-Streptomisine et 1% L-Glu (Hyclone), à 37 °C dans une atmosphère de 5% CO₂. Ensuite, les cellules U937 ont été exposées à 150 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, St Louis, MO) pendant 60 minutes et les cellules NIH/3T3 ont été exposées à 400 nM trichostatin A (TSA) (Sigma) pendant 16 heures. Les cellules U937 et NIH/3T3, traitées et non traitées, ont été recueillies, lavées au PBS (phosphate buffer saline solution) (Hyclone) et re-solubilisées en tampon isotonique de lyse (10 mM Tris-HCl (EMD Biosciences, Gibbstown, NJ), 300 mM sucrose, 2 mM MgCl₂ et 3 mM CaCl₂ (Sigma)) auquel on a ajouté des inhibiteurs de

protéases et de phosphatases (Sigma, St Louis, MO). Après la lyse cellulaire, les extraits cellulaires nucléaires ont été obtenus par centrifugation à 10000g pendant 10 minutes. Le culot nucléaire des cellules U937 a ensuite été ré-suspendu dans 3 volumes de 0.3 N HCl, agité vigoureusement et incubé sur la glace pendant 30 minutes. Les histones ont été précipitées dans 5 volumes d'acétone pendant 1 heure à -20 °C et après centrifugation pendant 15 minutes à 12000g, ré-suspendus dans 0.2 % FA. La concentration totale des protéines a été mesurée à l'aide d'une trousse d'analyse micro BCA (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Pour les analyses de confirmation des sites des PTM, les protéines intactes de chaque échantillon (77 µg) d'extrait nucléaire NIH/3T3, traité ou non avec de TSA, ont été fractionnées par HPLC (1100 Series LC/UV, Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne), sur une colonne remplie de phase stationnaire Jupiter C₁₈, 300 Å, de taille de 5µm, ayant une longueur de 150 mm et un diamètre interne de 1 mm (Phenomenex, Torrance, CA, É-U). L'élution a été faite à 25 µL/min avec un mélange d'eau (A) et d'acétonitrile (B), contenant 0.1% TFA chacun. Des fractions ont été collectées à chaque minute durant les 45 minutes du gradient (de 10 à 80% B). Les fractions contenant l'histone H4, ont été lyophilisées à sec, ensuite re-dissoutes dans 50 µL 100 mM bicarbonate d'ammonium (pH 8) et traités avec 50 µL de réactif de propionylation (3/1 méthanol/anhydride propionique ajusté à pH 8 avec du hydroxyde d'ammonium concentré) pendant 30 minutes à température ambiante. Le mélange de réaction a été ensuite lyophilisé à sec et le résidu dissout en 50 µL 100 mM bicarbonate d'ammonium supplémenté avec 6% ACN. Une solution (10 µL) 0.1 µg/µL trypsine a été ajoutée et incubée à 37 °C pendant la nuit. Après cette digestion, chaque échantillon a été acidifié avec 10 µL d'eau contenant 5% TFA. Des aliquots de 2.5 µL ont été injectées sur la puce nano-HPLC couplé au MSD Trap XCT Ultra.

5.2.3 Analyse par immunobuvardage

Les échantillons d'extrait cellulaire nucléaire (20 µg chaque) ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose (Pall Corporation, Pensacola, FL, É-U) à 600 mA constant pendant 1.5 heures, à 4 °C. La membrane a été bloquée dans une solution 0.1% TBST (Tris Buffered Saline-Tween) contenant 5% de lait en poudre

pendant 1 h sous agitation, à la température de la pièce. La membrane a été ensuite incubée sur la nuit avec l'anticorps primaire, sous agitation à 4°C. L'anticorps a été utilisé à une concentration de 1 :1000 dans une solution de TBST. Les anticorps spécifiques aux protéines Acetyl-Histone H2A (Lys5), Acetyl-Histone H2B (Lys12), Acetyl-Histone H3 (Lys9) et Acetyl-Histone H4 (Lys8) (# 9933, Cell Signaling, Technologie, Danvers, MA, É-U) ont été utilisés comme anticorps primaires. La membrane a ensuite été lavée 3 fois avec du TBST (15 min chaque fois). La membrane a été par la suite incubée pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire de lapin (AP308P, Chemicon, Temecula, CA, É-U), sous agitation à la température de la pièce. L'anticorps secondaire a été utilisé à une concentration de 1 :5000 dans du TBST. Ultérieurement, la membrane a été lavée 3 fois avec du TBST (15 min chaque fois). Finalement, les bandes ont été visualisées par chemiluminescence (ECL) et la membrane exposée à un film XAR (Cie univ de rayons X du Canada) et révélée par utilisation du développeur Kodak.

5.2.4 Analyses puce nano-HPLC-MS

Pour les analyses de séparation des protéines intactes, une puce nano-HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) munie d'une pré-colonne de 30 nL et d'une colonne chromatographique de 45 x 0.075 x 0.05 mm a été employée. La pré-colonne et la colonne de séparation ont été remplies d'une phase stationnaire macroporeuse Zorbax mRP-C18 5 µm (Agilent Technologies). Le système microfluidique a été couplé au système 1100 Series LC - MSD - TOF (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) par l'interface prototype Rev3. Pour les analyses MS en tandem, afin de confirmer les PTM de l'histone H4, une puce nano-HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) ayant une pré-colonne de 40 nL et une colonne de séparation de 43 x 0.075 x 0.05 mm a été utilisée. La pré-colonne et la colonne de séparation ont été garnies de phase stationnaire Jupiter C₁₈ avec des particules d'une taille de 5 µm. La puce nano-HPLC a été couplée à un système 1100 Series LC – Trap XCT Ultra (Agilent Technologies) par l'interface chip-cube commerciale. Les conditions chromatographiques expérimentales sont présentées dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1 Conditions chromatographiques expérimentales pour la séparation des protéines intactes et pour l'identification des sites de PTM.

Paramètres	Conditions expérimentales														
<i>A) Séparation des protéines intacte:</i>															
Puce nano-HPLC:															
Pré-colonne:	Zorbax 5 µm mRP-C18, 40 nL														
Colonne chromatographique:	Zorbax 5 µm mRP-C18, 170nL														
Débit de chargement d'échantillon	4 µL/min														
Phase mobile pour charger l'échantillon	H ₂ O avec 3% ACN et 0.2% FA														
Volume d'injection	5 µL														
Position de la micro valve de la puce nano-HPLC	0 min – chargement 4 min – analyse 67 min – chargement														
Débit d'élution	300 nL/min														
Phase mobile d'élution	A : H ₂ O avec 0.2% FA B : ACN avec 0.2% FA														
Gradient: Méthode avec tableau du temps	<table> <tr> <th>Temps (min)</th><th>%B</th></tr> <tr> <td>0</td><td>15</td></tr> <tr> <td>4</td><td>15</td></tr> <tr> <td>61</td><td>60</td></tr> <tr> <td>65</td><td>70</td></tr> <tr> <td>66</td><td>70</td></tr> <tr> <td>67</td><td>15</td></tr> </table>	Temps (min)	%B	0	15	4	15	61	60	65	70	66	70	67	15
Temps (min)	%B														
0	15														
4	15														
61	60														
65	70														
66	70														
67	15														
<i>B) Identification des sites de PTM:</i>															
Puce nano-HPLC:															
Pré-colonne:	Jupiter 300Å, 5 µm C ₁₈ , 40 nL														
Colonne chromatographique:	Jupiter 300Å, 5 µm C ₁₈ , 170 nL														
Débit de chargement d'échantillon	4 µL/min														
Phase mobile pour charger l'échantillon	H ₂ O avec 0.2% FA														
Volume d'injection	2.5 µL														
Débit d'élution	300 nL/min														

Phase mobile d'élution	A : H ₂ O avec 0.2% FA	
	B : ACN avec 0.2% FA	
Gradient: Méthode avec IFV (IFV = 3)	Temps (min)	%B
	0	0
	1	0
	51	90
	56	90
	57	0
Solvant de lavage d'aiguille :	H ₂ O avec 20% MeOH et 0.2% FA	

Les conditions d'opération du spectromètre de masse MSD-Trap XCT Ultra sont présentées dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2 Conditions d'opération du spectromètre de masse MSD - TOF pour la séparation des protéines intactes.

Paramètres	Conditions expérimentales
Mode d'ionisation	Positif
Fragmentor (V):	250
Skimmer (V):	80
OCT RF V (V):	250
Température du gaz de séchage (°C):	350
Débit de gaz de séchage (L/min):	5.0
Domaine de balayage (m/z):	400 – 3000
Voltage du capillaire (V):	2000

Les conditions d'opération du spectromètre de masse oaTOF sont présentées dans le tableau 5.3

Tableau 5.3 Conditions d'opération du spectromètre de masse MSD-Trip XCT Ultra pour l'identification des sites de PTM.

Paramètres	Conditions expérimentales
Mode d'ionisation	Positif
Température du gaz de séchage (°C):	300
Débit de gaz de séchage (L/min):	3.5
Voltage du capillaire (V):	1950
Skimmer 1 (V):	30
Sortie du capillaire (V):	75
Moyennes:	1
ICC: active	
Le temps maximum d'accumulation:	150 ms
Smart target:	500000
Domaine de balayage (m/z):	400 – 3000
MS-MS automatique	MS : “standard-enhanced” MS-MS : “ultra-scan”
Nombre de précurseurs:	3
Moyennes:	1
Amplitude de fragmentation (V):	1.3
Exclusion active:	active, 2 spectres, 1 min
Préférer +2:	active
Domaine de balayage MS-MS (m/z):	100-2200
ICC target :	500000

5.2.5 Recherche des résultats de MS en tandem et corrélation avec une base de données

L'analyse de recherche sur base de données a été réalisée avec une base de données non redondante NCBI pour l'espèce de souris, en utilisant le logiciel Mascot (Matrix Science, Londres, Angleterre). Les tolérances de masse pour les ions parents et pour les ions fragments ont été fixées à ± 0.6 Da.

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 L'évaluation de la reproductibilité chromatographique pour les analyses de séparation des protéines intactes

Des analyses préliminaires ont d'abord été effectuées pour évaluer la reproductibilité du système intégré puce nano-HPLC dans le contexte de séparations des protéines intactes. Afin d'améliorer l'efficacité de la séparation chromatographique la puce nano-HPLC a été garnie d'une phase stationnaire macroporeuse à phase à polarité inversée Zorbax mRP-C18. Cette phase stationnaire, spécialement conçue pour réduire la forte adsorption des protéines, assure un taux de recouvrement supérieur à 95% par rapport à la quantité chargée [191]. Des aliquots de 200 ng d'extrait cellulaire nucléaire NIH/3T3 ont été injectés en triplicata sur la puce nano-HPLC. Un groupe de 25 protéines détectées de façon reproductible à travers les triplicatas a été utilisé afin d'évaluer la reproductibilité en termes d'intensité et de temps de rétention. Les intensités et les temps de rétention des trois ions multiplement chargés les plus abondants pour chacune de ces protéines ont été déterminés. La distribution des intensités comparée à la valeur moyenne est représentée à la figure 5.2a. Tous les ions multiplement chargés sont étroitement distribués le long de la ligne à 45° indiquant une bonne reproductibilité. La variation d'intensité est plus prononcée pour les ions de faible abondance que pour les ions plus intenses. En effet, l'écart type relatif de l'intensité augmente de 6.5% pour les ions ayant une intensité plus élevée que 25000 counts, à 18.3% pour les ions d'une intensité plus faible que 4000 counts. La valeur médiane de 14% pour l'écart type des intensités mesurées pour ces 75 ions, montre une bonne reproductibilité de leur intensité. De façon similaire, les mesures effectuées sur le temps de rétention pour ces 75 ions multiplement chargés confirment une très bonne reproductibilité de la puce nano-HPLC pour la séparation des protéines.

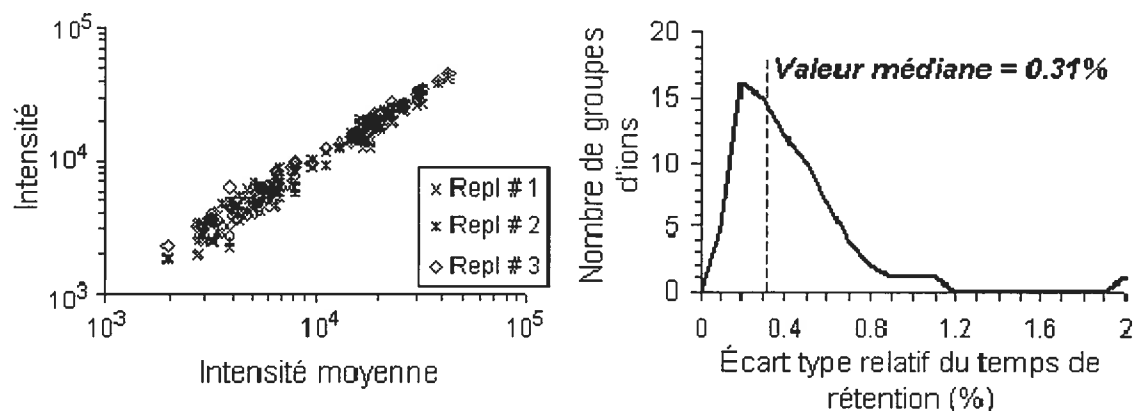


Figure 5.2 Reproductibilité de l'analyse de séparation des protéines intactes d'un extrait nucléaire NIH/3T3 (200 ng) sur une puce nano-HPLC. a) Diagramme de dispersion des intensités de trois ions multiement chargés les plus abondants mesurées pour 25 protéines détectées de façon reproductible à travers des triplicatas. b). Variation du temps de rétention (conditions identiques à celles du point a).

La valeur mediane de l'écart type relatif du temps de rétention est de 0.31% (figure 5.2b), alors que les variations maximales sont de 0.03% à 1.9%. Ces résultats demontrent l'excellente reproductibilité du système microfluidique puce nano-HPLC pour l'analyse des protréines.

5.3.2 La détection des modifications post-traductionnelles des histones

La reproductibilité et la résolution de la puce nano-HPLC permettent de séparer et de détecter des changements significatifs observés pour les profils d'expression des isoformes de protéines obtenues à partir des mélanges cellulaires complexes. Dans ce contexte, nous avons analysé les extraits d'histones pour la lignée cellulaire NIH/3T3 avant et après le traitement au TSA. L'antibiotique antifongique TSA, avec ses propriétés de différenciation cytostatiques dans les cultures cellulaires des mammifères, est connu comme un inhibiteur spécifique de l'activité d'histone des-acétylase. On a montré que le TSA induit une hyper-acétylation de l'histone H4 et qu'il est un fort inhibiteur de la prolifération du cancer du sein [192].

Les cultures cellulaires de NIH/3T3 poussées ont été séparées en deux et une partie a été traitée avec du TSA pendant 16 h. Des aliquots de 200 ng d'extrait cellulaire nucléaire de chaque échantillon ont été injectés en triplicatas sur une puce nano-HPLC remplie d'une phase stationnaire Zorbax mRP-C18. Les fichiers bruts (*.wiff) générés par le logiciel d'acquisition du MSD - TOF ont été traités par un logiciel maison afin d'obtenir les profils contour des extraits de protéines intactes. Les masses moléculaires des protéines intactes ont été déterminés par déconvolution en employant le logiciel BioConfirm (Version A.02.00, Agilent Technologies). Les profils moléculaires des protéines obtenus pour les extraits cellulaires nucléaires de NIH/3T3 ont permis de détecter plus de 85 protéines différentes ayant des masses moléculaires couvrant une gamme de 7800 à 54000 Da. Plusieurs d'entre elles ont montré une variation d'abondance ou de masse moléculaire suite au traitement avec l'inhibiteur d'acétylase d'histones TSA. La figure 5.3 montre les profils contour des protéines intactes, obtenus pour les extraits nucléaires NIH/3T3 avant (a) et après (b) l'incubation au TSA. Les détails agrandis des ions multiplement chargés $[M + 16H]^{16+}$ correspondants à l'histone H4, révèlent l'augmentation d'abondance d'une forme acétylée (712.89^{+16}) et l'apparition de deux nouvelles forme acétylées (715.52^{+16} et 718.15^{+16}) après l'exposition au TSA. Ces trois ions sont encadrés par un rectangle sur l'agrandissement de la figure 5.3b). Les masses moléculaires des formes de l'histone H4 ont été obtenues (figure 5.3c et d). Dans l'extrait cellulaire nucléaire non traité, la forme acétylée à l'azote terminale de l'histone H4 correspond à celle attendue avec une précision sur la masse de 26.6 ppm (masse expérimentale 11278.5 et masse théorique 11278.2). D'une façon similaire, les masses de 11292.2, 11306.6, 11348.6 et 11390.7 Da sont attribuées à l'histone H4 mono-méthylée, di-méthylée, di-méthylée et acétylée, et di-méthylée-di-acétylée (figure 5.3c). Les cellules exposées au TSA présentent deux nouvelles formes portant des sites supplémentaires d'acétylation, de masse moléculaire de 11432.5 et 11474.4 Da. On remarque aussi un changement dans l'intensité relative des formes par rapport à l'échantillon contrôle.

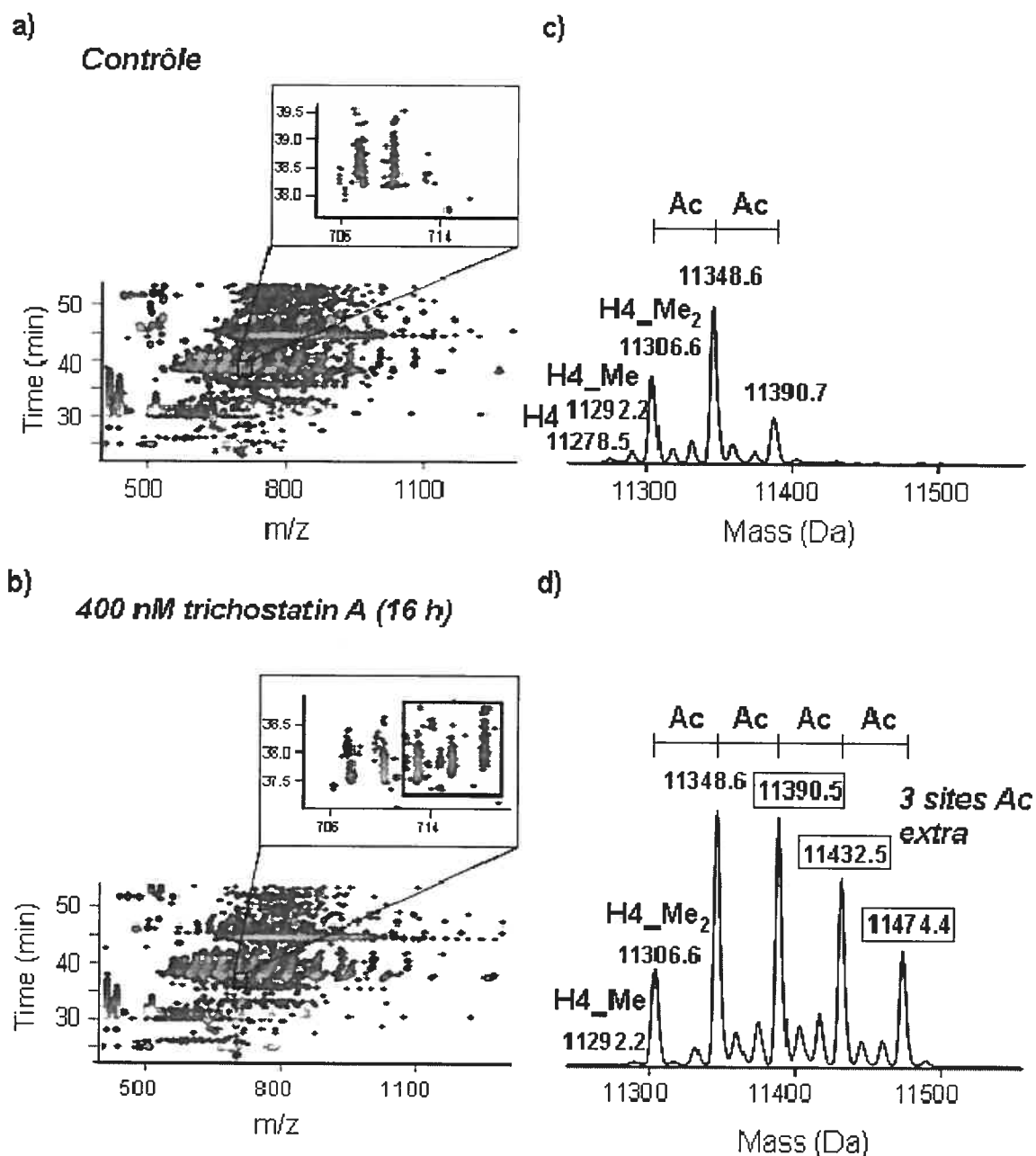


Figure 5.3 Identification de l'expression différentielle des formes acétylées et/ou méthylées de l'histone H4 des extraits cellulaires nucléaires NIH/3T3 (200 ng) après exposition au TSA. Profils contour des extraits de protéines intactes avant (a) et après (b) le traitement avec du TSA. Les agrandissements montrent les différentes formes de l'ion multiplement chargé $[M + 16H]^{16+}$ de l'histone H4. Profils de déconvolution de l'histone H4 dans l'échantillon contrôle (c) et dans celui exposé au TSA (d), normalisés en termes d'intensité.

La forme di-méthylée et di-acétylée (11390.5 Da) présente une augmentation en abondance d'un facteur de 5 alors que la forme di-méthylée et acétylée (11348.6 Da) montre un accroissement d'un facteur de 1.6 (figure 5.3d). L'histone H2AX a été détectée à la masse moléculaire de 15053.9 Da avec une exactitude de 33.2 ppm (dans l'échantillon contrôle) par rapport à la masse moléculaire théorique de 15053.4 Da (figure 5.4a). Cette masse correspond à la forme mono-acétylée au N-terminal. Les deux autres formes détectées à 15095.7 Da et 15137.6 Da présentent, respectivement, un et deux sites d'acétylation supplémentaires. Ces formes ont montré un accroissement d'abondance d'un facteur de 4.4 et 2.8 suite au traitement au TSA (figure 5.4b). Dans les cas des histones, les lysines peuvent être modifiés par mono, di ou tri méthylation (+14 Da, +28 Da, +42 Da) alors que l'acétylation induit un changement de +42 Da [193, 194]. Une confirmation est nécessaire pour faire la distinction entre l'acétylation et la triple méthylation. Pour confirmer l'identification de l'acétylation des différents types d'histones, des analyses par immunobuvardage de type Western en employant des anticorps spécifiques à certains sites acétylés des histones, ont été effectuées. L'immunobuvardage a été effectué par transfert protéique de type Western sur une membrane de nitrocellulose, en chargeant sur le gel 20 µg d'extrait cellulaire nucléaire pour chacune des analyses (Acetyl-Histone H2A (Lys5), Acetyl-Histone H2B (Lys12), Acetyl-Histone H3 (Lys9) et Acetyl-Histone H4 (Lys8)). L'augmentation du degré d'acétylation de l'histone H2AX suite à l'exposition au TSA est ainsi confirmée par les résultats de l'analyse par immunobuvardage (figure 5.4c).

Dans l'échantillon non traité l'histone H2B1 a été détectée à 13775.4 Da, ce qui représente une exactitude de 36.3 ppm par rapport au poids moléculaire théorique de 13774.9 Da. Plusieurs formes méthylées (séparées par 14 Da) et acétylées (séparées par 42 Da) ont aussi été détectées (figure 5.4d). Après le traitement au TSA de nouvelles histones de masse plus élevée (+14 Da et/ou +42 Da) ont été identifiées (figure 5.4e). L'augmentation du degré d'acétylation de H2B1 suite à l'exposition au TSA a également été confirmée par immunobuvardage (figure 5.4f).

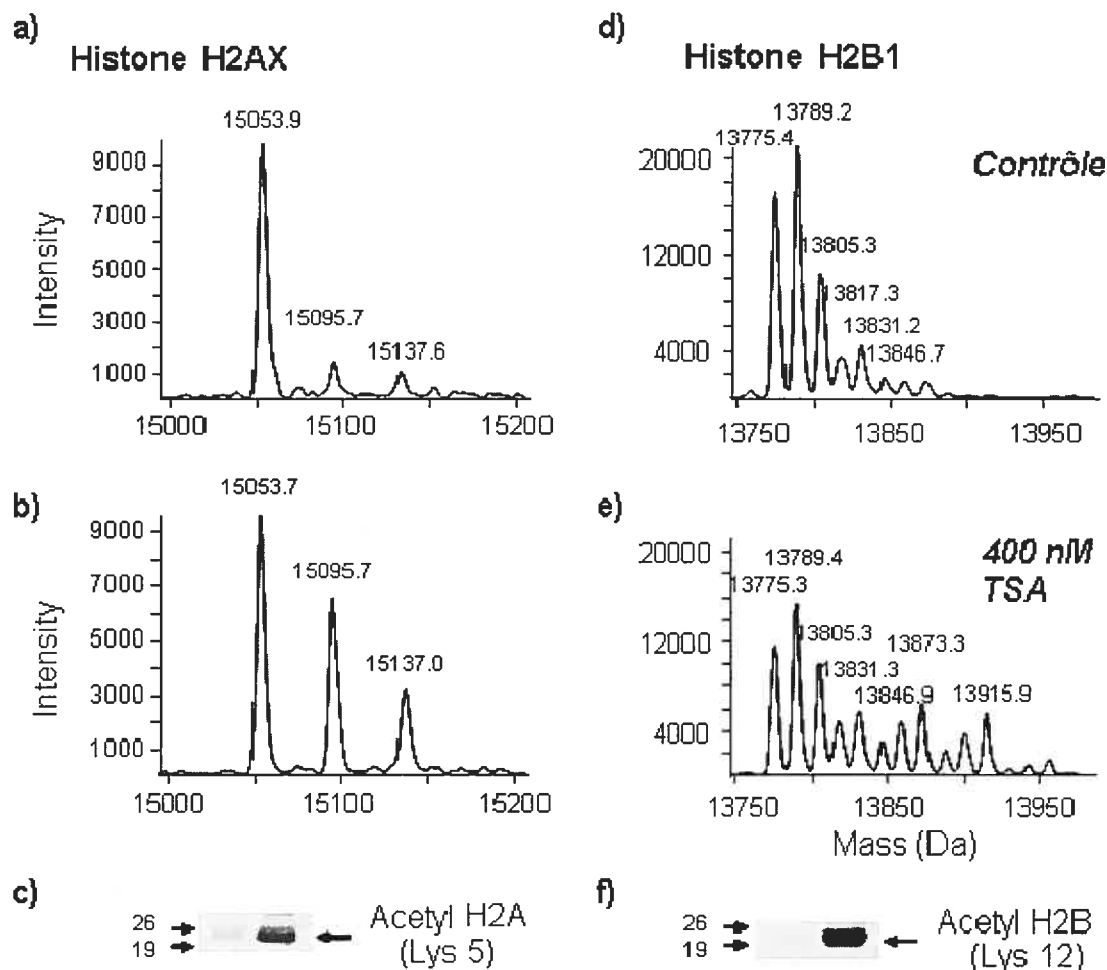


Figure 5.4 Détection des formes acétylées et méthylées des histones H2AX et H2B1. Profils moléculaires des échantillons contrôle (a) et (d) et exposés au TSA (b) et (e). Identification des sites d'acétylation des histones H2AX (c) et H2B1 (f) par immunobuvardage de type Western; le puit de gauche représente le contrôle et celui à droite correspond à l'échantillon exposé au TSA (20 µg d'extrait cellulaire nucléaire ont été chargés sur le gel pour chaque puits).

De façon similaire, la figure 5.5 présente les profils moléculaires de l'histone H4 et de l'histone H3.1 dans l'échantillon contrôle (a) et (d) et dans celui traité avec du TSA (b) et (e). L'histone H3.1 a été détectée dans l'échantillon contrôle à 15275.3 Da (+ 157.1 ppm par rapport à la masse théorique de 15272.9 Da) et celle-ci est accompagnée de plusieurs formes méthylées et acétylées (figure 5.5d). L'enveloppe des masses de l'histone H3.1 montre l'apparition de nouvelles formes multiplement

acétylées et méthylées ainsi qu'un changement dans l'abondance relatives de certaines formes suite au traitement au TSA (figure 5.5e). Pour confirmer l'identification de l'acétylation par rapport à la triple méthylation, des analyses par immunobuvardage ont été effectuées (figure 5.5f).

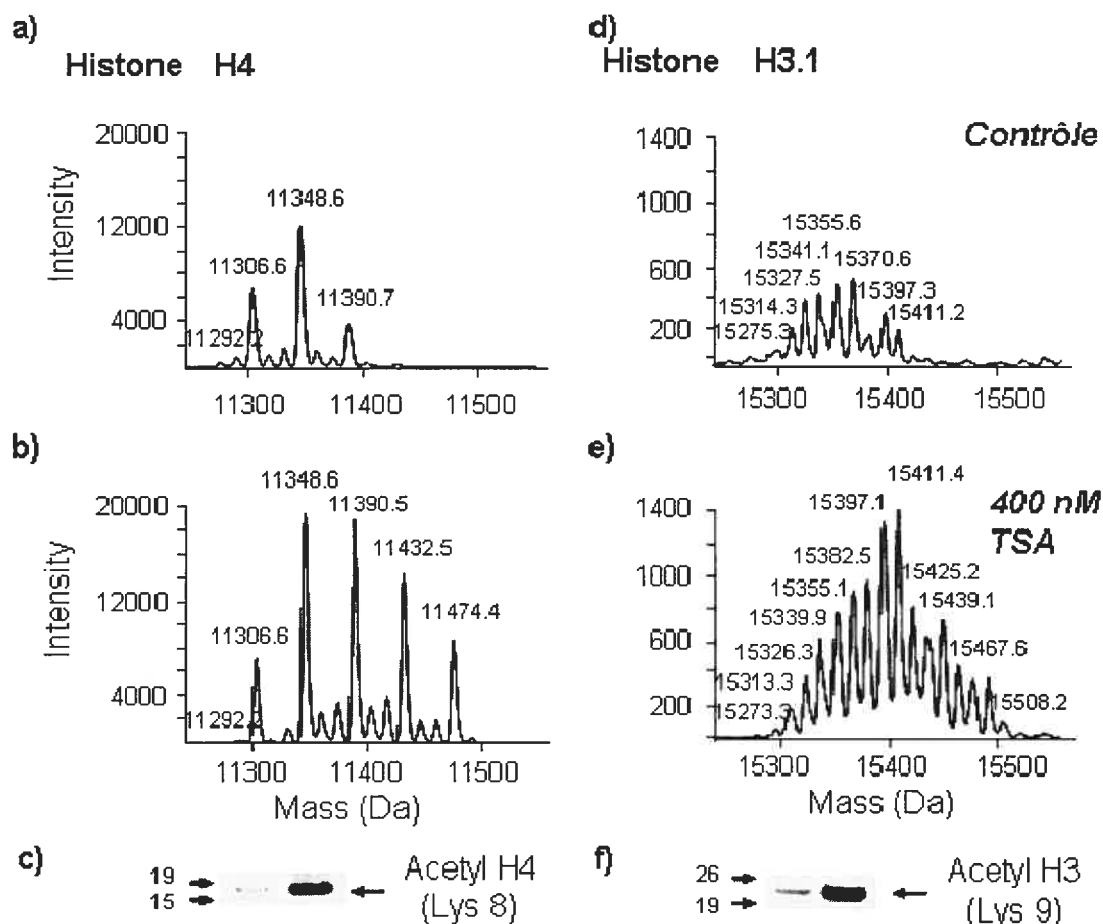


Figure 5.5 Détection des formes acétylées et méthylées des histones H4 et H3.1. Profils des masses moléculaires dans l'échantillon contrôle (a) et (d) et dans celui exposé au TSA (b) et (e). Evaluation du degré d'acétylation des histones H4 et H3.1 de l'extrait cellulaire nucléaire NIH/3T3 contrôle (puits gauche) et exposé au TSA (puits droite) par immunobuvardage de type Western avec anti-Acetyl His (c) et (f) respectivement.

Puisque, dans les cas des histones, les lysines peuvent être modifiées par mono, di ou tri méthylation (+14 Da, +28 Da, +42 Da) et par l'acétylation (+42 Da)

[193, 194] une confirmation serait nécessaire pour en faire la distinction. Pour confirmer l'identification de l'acétylation des différents types d'histones, des analyses par immunobuvardage de type Western en employant des anticorps spécifiques anti-Acetyl-His ont été effectuées (figures 5.4c et 5.5c).

Il est à noter que les mêmes analyses effectuées sur des extraits d'histones obtenus des cellules traitées ou non avec du PMA, n'ont pas montré de changement significatif des profils moléculaires d'histones. Les distributions des masses moléculaires des extraits des histones étaient presque superposables. Cette observation suggère qu'il n'y a pas de changement dans la distribution des modifications post-traductionnelles des histones suite à cette stimulation chimique.

5.3.3 L'identification des PTM et de leurs sites de modifications pour l'histone H4

Alors que les analyses LC/MS des protéines intactes donnent des informations importantes concernant la nature dynamique de PTM d'histones, elles ne peuvent pas indiquer les acides aminés modifiés. Pour ce, nous avons fractionné des échantillons d'histone H4 (77µg chaque) contrôle et traités avec du TSA afin de simplifier la complexité de l'extrait cellulaire nucléaire NIH/3T3 et d'augmenter la sensibilité d'analyse. Les fractions contenant l'histone H4 ont été propionilées avec l'anhydride propionique et ensuite digérées par la trypsine. Des aliquots de 2.5 µL de chaque échantillon ont été injectés sur une puce nano-HPLC (phase stationnaire Jupiter C₁₈) couplée à un MSD Trap XCT Ultra à l'aide de l'interface chip-cube.

L'étape de propionilation est requise puisque la majorité des PTM de l'histone H4 sont localisées au voisinage du N-terminal, une région très hydrophile et riche en lysine et arginine. Les peptides tryptiques qui en résultent sont donc trop petits et très hydrophiles et seraient faiblement retenus sur la phase stationnaire et donc très difficile à détecter. La réaction de propionilation convertit les amines des lysines en amides propionilées. La basicité est réduite et une partie hydrophobe est ajoutée à chaque amine non modifiée ou mono méthylée des lysines. Les résidus ainsi modifiés ne sont plus reconnus par la trypsine. De cette façon, les fragments tryptiques résultants sont plus longs et plus hydrophobes et donc plus facile à analyser. De plus, pour

améliorer la rétention des peptides sur la pré-colonne de la puce, l'échantillon a été chargé en employant de l'eau avec 0.2% FA sans ajout de phase organique. Les analyses subséquentes par MS-MS ont permis d'identifier l'histone H4 avec une couverture de la séquence de 59% pour le type contrôle et de 62% pour l'échantillon traité au TSA. De plus, ces analyses nous ont permis d'identifier les sites d'acétylation des deux nouvelles formes apparues après le traitement des cellules NIH/3T3 avec TSA (détectées aussi par les analyses LC – MS des protéines intactes).

La figure 5.6 montre les chromatogrammes reconstruits et normalisés des ions peptidiques m/z 734.3²⁺ (a) et m/z 720.4²⁺ (b) pour les extraits cellulaires nucléaires NIH/3T3 contrôle et traité avec TSA. L'ion peptidique doublement chargé m/z 734.3 montre une augmentation de 2.8 fois dans les cellules exposées au TSA par rapport à l'échantillon contrôle. La corrélation du spectre MS-MS de m/z 734.3²⁺ avec les résultats de la recherche de banque de données (en employant le logiciel Mascot) révèlent la séquence partielle suivante pour l'histone H4: G⁵KGG⁸KGLG¹²KGGA¹⁶KR (figure 5.6c). Dans cette séquence les lysines 5 et 8 sont propionilées, confirmant ainsi que l'échantillon contrôle contient des lysines libres. Par contre, les lysines 12 et 16 sont acétylées et l'accroissement d'abondance de l'ion m/z 734.3²⁺ d'un facteur de 2.8 dans l'extrait traité avec du TSA suggère l'apparition de ces formes suite à l'incubation au TSA. La comparaison des profils des chromatogrammes de l'ion peptidique doublement chargé m/z 720.4²⁺ montre une augmentation significative de 25 fois dans l'extrait cellulaire nucléaire traité avec du TSA par rapport à l'extrait non traité où l'ion est presque inexistant. La séquence correspondante identifiée par les analyses MS-MS de cet ion est : G⁵KGG⁸KGLG¹²KGGA¹⁶KR (figure 5.6d). Pour cet ion peptidique les lysines 5 et 8 sont aussi acétylées, justifiant ainsi l'accroissement de cet ion dans l'échantillon exposé au TSA. Le fait que ces résidus ont été acétylés suite au traitement avec du TSA, a empêché les lysines d'être propionilées.

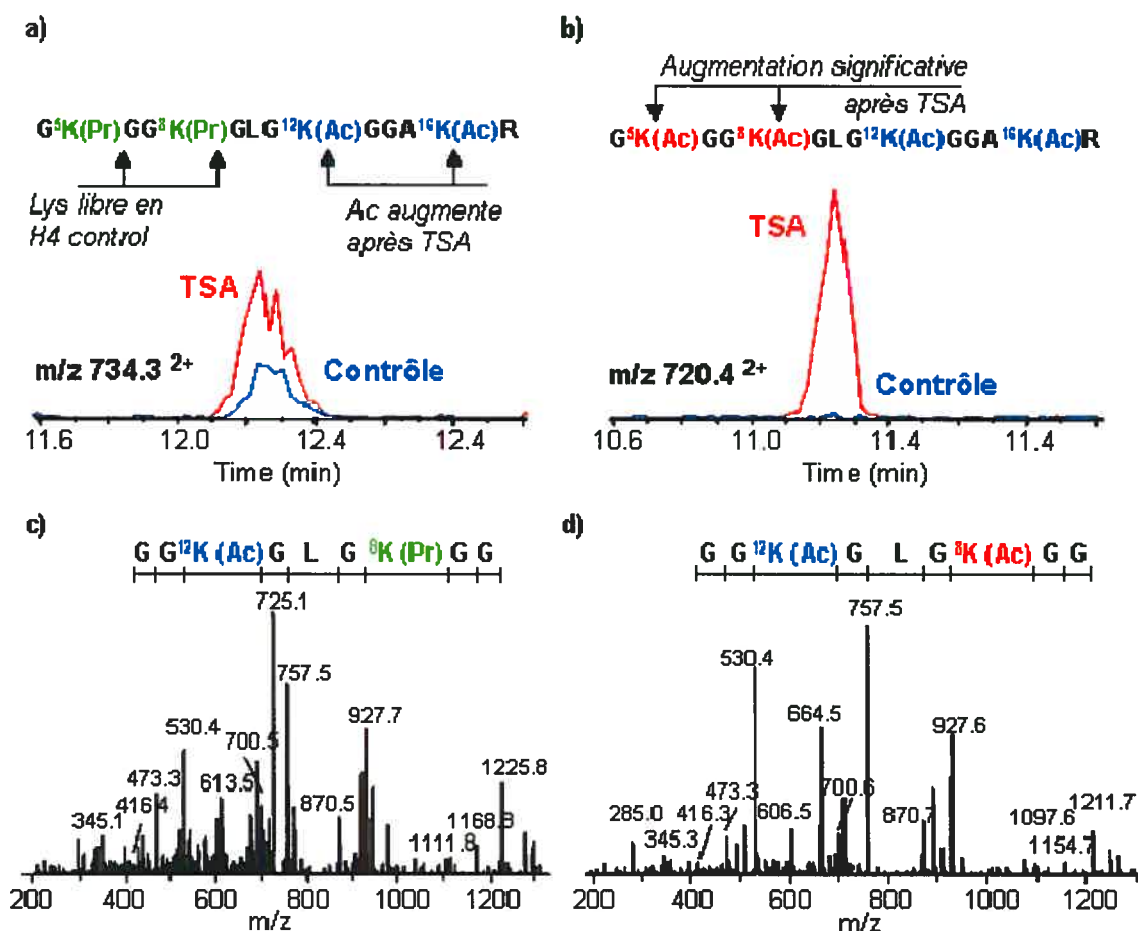


Figure 5.6 Identification des résidus de l'histone H4 avec des PTM différenciellement exprimés après le traitement avec du TSA. Chromatogrammes reconstruits normalisés des ions (a) m/z 734.3²⁺ et (b) m/z 720.4²⁺ montrant des abondances différentes pour la fraction de l'histone H4 de l'extrait nucléaire NIH/3T3 contrôle et celui exposé au TSA. Spectres MS-MS des ions m/z 734.3²⁺ (c) et m/z 720.4²⁺ (d) confirmant l'identification de la protéine et des sites d'acétylation.

Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature [195-197], qui décrivent acétylation de l'histone H4 aux lysines 5, 8, 12 et 16. De plus, Zhang et al. [198], ont suggéré que l'ordre de progression d'acétylation commence à la lysine 16 et continue consécutivement aux lysines 12, 8 et 5, et que la des-acétylation a lieu dans l'ordre inversé pour l'histone H4 des cellules HeLa traitées avec du butyrate.

5.4 Conclusion

Le couplage du système microfluidique puce nano-HPLC avec ESI-MS offre des avantages remarquables pour la recherche protéomique, non seulement pour les analyses de digestats tryptiques mais aussi pour la caractérisation des protéines intactes. Afin d'améliorer l'efficacité de séparation de la puce nano-HPLC, une phase stationnaire macroporeuse a été utilisée pour réduire l'adsorption des protéines, ce qui a permis 95% de recouvrement des protéines par rapport à la quantité injectée. L'analyse des ions multiplement chargés les plus abondants, mesurés pour 25 protéines détectées de façon reproductible parmi les triplicatas d'un extrait cellulaire nucléaire NIH/3T3 (200 ng chaque injection), a montré une très bonne reproductibilité, avec un écart type relatif de 0.31% pour le temps de rétention et de 14% pour l'intensité.

La séparation des mélanges complexes de protéines intactes d'extrait nucléaire NIH/3T3 sur la puce nano-HPLC couplée au MSD-TOF a permis de détecter plus de 85 protéines différentes ayant une masse moléculaire variant de 7800 à 54000 Da. Les profils moléculaires ont permis la détection de différentes formes d'histones, incluant les modifications post-traductionnelles telles la méthylation et l'acétylation. Suite à l'exposition au TSA, les profils moléculaires ont montré l'apparition de nouvelles formes ayant un degré d'acétylation plus élevé et une variation d'abondance relative. La confirmation de l'identification de l'acétylation des différents types d'histones après l'exposition au TSA a été effectuée par immunobuvardage de type Western en employant des anticorps spécifiques anti-Acétyle His.

La distribution des masses moléculaires des extraits nucléaires des histones de la ligne cellulaire U937 traités ou non avec du PMA était presque superposable, indiquant qu'il n'y a pas eu de changement significatif dans la distribution des modifications post-traductionnelles des histones suite à cette stimulation chimique.

6. Conclusion générale

Les systèmes microfluidiques développés durant les dernières années offrent une bonne reproductibilité, une vitesse de séparation élevée, une grande sensibilité et une quantité réduite d'échantillon et de réactifs. Ces caractéristiques en font un outil très prometteur pour des études protéomiques impliquant la séparation et l'identification des peptides et des protéines de faible abondance dans les extraits biologiques complexes. Ce projet porte sur l'évaluation d'un système microfluidique intégré, la puce nano-HPLC, basé sur la séparation par HPLC et la détection par ESI-MS pour différentes applications protéomiques.

La puce nano-HPLC intègre sur la même puce une pré-colonne, une colonne chromatographique et un émetteur d'électronébulisation. Ce système représente, à l'échelle miniaturisée, les composants conventionnels d'un système de séparation par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse et utilisant l'ionisation par nébulisation électrostatique. Ce type de système apporte une réduction significative des volumes morts, des lignes de transfert et des connections par rapport à la séparation nano-LC/MS conventionnelle se traduisant ainsi par une amélioration des performances chromatographiques, de la fiabilité et de la facilité d'utilisation du système. La puce nano-HPLC a été d'abord caractérisée en termes de capacité de charge. L'influence de la direction d'élution par rapport à la direction de chargement de la pré-colonne et l'influence de la température ont été ensuite évaluées. Un digestat trypsique de huit protéines, représentant un mélange complexe de peptides a été utilisé comme échantillon lors de l'évaluation du système. Une variation linéaire de l'intensité des ions a été observée sur plus de trois ordres de grandeur pour une capacité de charge de 100 ng, en utilisant une puce nano-HPLC ayant une pré-colonne de 30 nL et une colonne chromatographique de 75 x 50 μm et de 45 mm de longueur (170 nL). Une amélioration de la capacité de charge allant jusqu'à 400 ng a été obtenue en utilisant une pré-colonne d'un volume plus grand, de 160 nL, avec une colonne analytique de 560 nL. Un phénomène progressif d'élargissement des pics, de diminution significative du temps de rétention ainsi que de détérioration de la réponse dans le spectromètre de masse a été observé au delà de la limite de chargement. Ces effets limitent la possibilité d'effectuer des analyses de quantification relative pour des quantités des échantillons qui dépassent la capacité de charge de la puce nano-HPLC. Une plus faible diminution des temps de

réten-tion des ions peptidiques est observée sur la plage des quantités injectées à travers le domaine linéaire. Cet effet est attribué à la modification de la sélectivité de la phase stationnaire dont les sites actifs sont recouverts de peptides adsorbés à leur surface. L'évaluation de la direction d'élution par rapport à la direction de chargement de l'échantillon sur la pré-colonne s'est fait sur un total de 1520 groupes de peptides détectés de façon reproductible parmi six replicatas. Les résultats ont montré une réduction d'intensité d'un facteur d'au moins 1.5 pour 28.2% des peptides hydrophiles dans le mode d'élution BFM. Aussi, 18.4% des peptides qui ont élués après 20 min ont eu une réponse 1.5 fois plus élevée en BFM.

Une diminution du temps de rétention pouvant aller jusqu'au 94 s pour plus de 90% des groupes de peptides détectés de façon reproductible ainsi qu'une réduction de 5% en termes de largeur des pics à mi-hauteur ont été observés en BFM par rapport à FFM. L'élution en FFM sur la puce nano-HPLC est donc favorable pour l'analyse des mélanges protéomiques complexes ayant comme cible les peptides plus hydrophiles. Des analyses préliminaires de l'influence de la température sur les performances de séparation de la puce nano-HPLC, ont montré que pour plus de 85% des groupes des peptides détectés de façon reproductible à travers la gamme de températures, le temps de rétention a diminué progressivement lorsque la température est augmentée de 20 °C à 60 °C. En accord avec les données de la littérature, un changement de sélectivité a été observé allant jusqu'à l'inversion de l'ordre d'élution à 60 °C pour certains peptides. Afin de mieux comprendre l'influence de la température sur les performances chromatographiques du système microfluidique, une étude similaire portant aussi sur des mélanges complexes des peptides pourrait se faire en diminuant la température de la pré-colonne pour favoriser l'adsorption des peptides et/ou en chauffant la colonne chromatographique afin d'améliorer la désorption des peptides correspondants.

La puce nano-HPLC donne des performances chromatographiques comparables à celles des colonnes chromatographiques capillaires ayant 75 mm de longueur et 150 µm de diamètre interne. L'analyse des profils de pic pour plus de 2200 groupes de peptides détectés de façon reproductible parmi 5 replicatas a fourni des valeurs de 0.22%, 0.003% et 10% pour les écarts types relatifs du temps de rétention, des valeurs m/z et de l'intensité. La sélectivité et les performances chromatographiques

de la puce nano-HPLC peuvent être améliorées avec des phases stationnaires différentes. Une augmentation de la capacité chromatographique de 2.5 fois a été obtenue en utilisant une puce nano-HPLC comportant une pré-colonne garnie de phase stationnaire C₃, 5 µm (colonne de séparation remplie de phase stationnaire C₁₈, 2.1 µm) par rapport à la phase conventionnelle C₁₈.

Le système microfluidique a été ensuite évalué dans le contexte des analyses du phosphoproteome. L'intégration d'une séparation sélective par IMAC avant la séparation sur la puce nano-HPLC, a facilité la détection des phosphopeptides de l' α -caséine dopée dans un digestat trypsique d'extrait protéique de macrophage de souris J774 (1.5 fmol dans 200 ng de digestat trypsique). Un enrichissement de 25 fois par rapport aux échantillons sans IMAC a été obtenu. Cette approche a été appliquée dans le cadre des analyses différentielles du phosphoproteome des cellules humaines U937 afin d'identifier les événements de signalisation précoce suite à l'exposition au PMA. Le profil d'expression de l'ensemble de la population enrichie identifiée de façon reproductible parmi les triplicatas a montré que 9% d'ions étaient sur-exprimés et 33% d'ions étaient sous-exprimés suite au traitement avec du PMA. L'identification des phosphopeptides, ainsi que la localisation des sites de phosphorylation sur les phosphoprotéines différentiellement exprimées ont été réalisées par des analyses MS en tandem. Celles-ci ont été effectuées sur une puce nano-HPLC couplée en ligne avec un MSD Ion Trap XCT Ultra. Par exemple, la phosphoprotéine ``human hepatoma-derived growth factor``, était sur-exprimée suite au traitement au PMA et celle-ci montre une phosphorylation sur la serine 165. Le même site de phosphorylation a été rapporté dans la littérature suite à des analyses du phosphoproteome nucléaire des cellules HeLa [128].

Une autre façon d'améliorer la capacité de charge, serait d'employer des séparations multi dimensionnelles. Une augmentation de jusqu'à 2 µg a été obtenue en intégrant une colonne SCX avant la puce nano-HPLC. Les séparations multi dimensionnelles permettent de simplifier la complexité d'échantillon en le divisant en plus petites fractions pouvant être analysées de façon successive. Sur la colonne SCX les peptides sont séparés d'abord selon leur point isoélectrique. Chaque fraction est ensuite séparée selon la hydrophobicité sur la phase à polarité inversée de la puce nano-HPLC. Cette configuration a été évaluée dans le contexte des analyses protéomiques

différentielles du modèle cellulaire U937 (monocyte/macrophage). Une très bonne reproductibilité a été obtenue parmi tous les replicatas et ce sur trois jours d'analyse. En effet, une variation de l'intensité inférieure à 35% pour plus de 95% des ions peptidiques détectés de façon reproductible a été observée au cours de ces expériences. La sensibilité ainsi que la reproductibilité remarquable de ce système a permis l'identification des protéines comme TCP-1, G-actin, tropomyosin, vimentin, qui ont toutes présenté des variations significatives en termes d'abondance suite au traitement avec du PMA. Ces variations étaient en accord avec les changements morphologiques attendus pendant la transformation des monocytes en macrophages. La disponibilité récente d'une phase stationnaire plus sélective (TiO_2) pour les phosphopeptides [160, 161], nous a permis d'évaluer le potentiel de cette approche pour l'analyse du phosphoprotéome du modèle cellulaire U937, en utilisant la puce nano-HPLC. Le profil d'expression des extraits enrichis de phosphopeptides a révélé que 17% de la population globale montre une augmentation reproductible en abondance, après le traitement avec du PMA. Parmi celles-ci, nous avons détecté les phosphopeptides appartenant aux protéines MARKS, stathmin, L-plastin, HSP90, c-Myc-reponsive protein Rcl, microfibrillar-associated protein 1, ras-GTPase-activating protein binding protein1, 14-3-3 et SRC substrate cortactin, lesquelles étant d'importants médiateurs de l'organisation et de la transformation cellulaire. Les analyses MS en tandem sur la puce nano-HPLC des extraits cellulaires de U937 ont permis d'identifier parmi les 138 phosphopeptides 152 phosphoserines, 25 phosphothréonines et 4 phosphotyrosines. De tous ces sites de phosphorylation approximativement 40 % étaient inconnus. Cette approche sera en outre utile dans les recherches en cancérologie pour comparer les phosphorylations associées aux cellules normales et cancéreuses.

La puce nano-HPLC a été ensuite évaluée dans le contexte de la séparation des protéines intactes des extraits cellulaires complexes. Pour ce, des extraits cellulaires nucléaires de NIH/3T3 traités ou non avec du TSA (200 ng) ont été séparés sur une puce nanoHPLC garnie d'une phase stationnaire macroporeuse. Ces analyses ont permis de détecter avec une très bonne reproductibilité, plus de 85 protéines différentes ayant une masse moléculaire de 7800 à 54000 Da. Plusieurs d'entre elles ont montré une variation en abondance ou en masse moléculaire suite à l'exposition au TSA. Par exemple, dans

l'échantillon d'extrait nucléaire NIH/3T3 non traité, l'histone H4 acétylée a été détectée et en plus une pléiade de formes multiplement acétylées et méthylées. Suite à l'exposition au TSA, deux nouvelles formes portant des sites supplémentaires d'acétylation ont été mises en évidence. On remarque aussi un changement de l'intensité relative des formes modifiées avant et après le traitement au TSA. Les histones H2A, H2B et H3 ont montré aussi des variations dans la distribution des différentes formes multiplement acétylées ou/et méthylées. Le couplage de la puce nano-HPLC au MSD-Trap XCT Ultra a permis d'identifier les résidus acétylés de l'histone H4 (Lys16, Lys12, Lys8 et Lys5) dans des digestats tryptiques des extraits nucléaires NIH/3T3 fractionnés et propionilés, traités ou non avec du TSA. Ces résultats montrent que le système microfluidique a un grand potentiel pour l'analyses des PTM des protéines intactes.

La capacité de la puce nano-HPLC-MS d'analyser avec sensibilité et reproductibilité des mélanges très complexes de biomolécules, en plus des avantages tels que sa fiabilité et sa facilité d'utilisation en font une plateforme puissante pour l'identification et l'expression différentielle des protéines et des molécules biologiquement actives.

7. Références

- [1] A. Manz, D.J. Harrison, E.M.J. Verpoorte, J.C. Fettinger, A. Paulus, H. Ludi, H.M. Widmer, *J. Chromatogr.*, 1992, 593, 253-258.
- [2] D.J. Harrison, A. Manz, Z.H. Fan, H. Ludi, H.M. Widmer, *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1926-1932.
- [3] D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz A., *Science*, 1993, 261, 895-897.
- [4] Q. Xue, F. Foret, Y.M. Dunayevskiy, P.M. Zavracky, N.E. McGruer, B.L. Karger, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 426-430.
- [5] R.S. Ramsey, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 1174-1178.
- [6] D. Figeys, R. Aebersold, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 3721-3727.
- [7] J. Li, P. Thibault, N.H. Bings, C.D. Skinner, C. Wang, C. Colyer, J. Harrison, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 3036-3045.
- [8] I.M. Lazar, R.S. Ramsey, S.C. Jacobson, R.S. Foote, J.M. Ramsey, *J. Chromatogr. A*, 2000, 892, 195-201.
- [9] D. Bandilla, C.S. Skinner, *J. Chromatogr. A*, 2004, 1044, 113-129. .
- [10] I.M. Lazar, L.J. Li, Y. Yang, B.L. Karger, *Electrophoresis*, 2003, 24, 3655-3605.
- [11] J.D. Ramsey, G.E. Collins, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 6664-6670.
- [12] C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 5814-5819.
- [13] J.D. Ramsey, S.C. Jacobson, C.T. Culbertson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 3758-3764.
- [14] A.P. Dahlin, S.K. Berrgström, P.E. Andrén, K.E. Markides, J. Bergquist, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 5356-5363.
- [15] A. Wainright, S.J. Williams, G. Ciambrone, Q. Xue, J. Wei, D. Harris, *J. Chromatogr. A*, 2002, 979, 69-80.
- [16] B. Jung, R. Bharadwaj, J.G. Santiago, *Anal. Chem.* 2006, 78, 2319-2327.
- [17] J. Li, C. Wang, J.F. Kelly, D.J. Harrison, P. Thibault, P., *Electrophoresis*, 2000, 21, 198-210.
- [18] J. Li, T. LeRiche, T.-L. Tremblay, C. Wang, E. Bonneil, D.J. Harrison, P. Thibault, *Mol. Cell. Proteomics*, 2002, 1, 157-168.
- [19] R.S. Foote, J. Khandurina, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 57-63.

- [20] S. Song, A.K. Singh, B.J. Kirby, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 4589-4592.
- [21] D.P. Little, T.J. Cornish, M.J. O'Donnell, A. Braun, R.J. Cotter, H. Köster, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4540-4546.
- [22] J. Preisler, F. Foret, B.L. Karger, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 5278-5287.
- [23] J. Preisler, P. Hu, T. Rejtar, B.L. Karger, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 4785-4795.
- [24] M. Gustafsson, D. Hirschberg, C. Palmberg, H. Jornvall, T. Bergman, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 345-350.
- [25] Y.-X. Wang, Y. Zhou, B.M. Balgley, J.W. Cooper, C.S. Lee, D.L. DeVoe, *Electrophoresis*, 2005, 26, 3631-3640.
- [26] L.A. Leuthold, C. Grivet, M. Allen, M. Baumert, G. Hopgartner, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18, 1995-2000.
- [27] C.A. Keetch, H. Hernandez, A. Sterling, M. Baumert, M.H. Allen, C.V. Robinson, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 4937-4941.
- [28] I.M. Lazar, B.L. Karger, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 6259-6268.
- [29] I.M. Lazar, P. Trisiripisal, H.A. Sarvaija, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 5513-5524.
- [30] J. Xie, Y. Miao, J. Shih, Q. He, J. Liu, Y.C. Tai, T.D. Lee, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 3756-3763.
- [31] J. Xie, Y. Miao, J. Shih, Y.C. Tai, T.D. Lee, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 6947-6953.
- [32] Y. Miao, J. Shih, Y.-C. Tai, M. Kalkum, T.D. Lee, *Fully Integrated Chip-based LC-ESI Systems with Flow Sensor and Feedback Control*, ASMS, Seattle, WA, May28-June1, 2006. Poster Presentation.
- [33] Y.-X. Wang, J.W. Cooper, C.S. Lee, D.L. DeVoe, *Lab Chip* 2004, 4, 363-367.
- [34] D. Figeys, Y. Ning, R. Aebersold, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 3153-3160.
- [35] Li, J., Kelly, J. F., Chernushevich, I., Harrison, D. J., Thibault, P., *Anal. Chem.*, 2000, 72, 599-609.
- [36] Meng, Z., Qi, S., Soper, S. A., Limbach, P. A., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1286-1291.
- [37] N.-H. Bings, C. Wang, C.D. Skinner, C.L. Colyer, P. Thibault, D.J. Harrison, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 3292-3296.
- [38] M. Schilling, W. Nigge, A. Rudzinski, A. Neyer, R. Hergenroder, *Lab Chip*, 2004, 4, 220-224.

- [39] S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier, C. Rolando, *J. Micromech. Microeng.*, 2004, 14, 310-316.
- [40] J. Carlier, S. Arscott, V. Thomy, J.-C. Camart, C. Cren-Olivé, S. Le Gac, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1071, 213-222.
- [41] M. Bedair, R.D. Oleschuk, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 1130-1138.
- [42] Y. Shen, R. Zhao, S.J. Berger, G.A. Anderson, N. Rodriguez, R.D. Smith, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 4235-4249.
- [43] M.-H. Fortier, E. Bonneil, P. Goodley, P. Thibault, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 1631-1640.
- [44] H. Yin, K. Killeen, R. Brennen, D. Sobek, M. Werlich, T. van de Goor, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 527-533.
- [45] M. Vollmer, C. Miller, G.L. Gauthier, *Application Note, Agilent Technologies*, 5989-3538EN, August 2005.
- [46] A. Bednarczyk, A. Hovasse, S. Gallien, C. Carapito, C. Schaeffer, A. Van Dorsselaer, *HPLC-Chip: Advantages and requirements of a new system used for LC-MS/MS analysis in proteomics*, XXIII SFSM Congress, Nantes, France 2006, Poster Presentation.
- [47] J. Hardoun, M. Duchateau, R. Joubert-Caron, M. Caron, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, 20, 3236-3244.
- [48] M.R. Ninonuevo, Y. Park, H. Yin, J. Zhang, R.E. Ward, B.H. Clowers, J.B. German, S.L. Freeman, K. Killeen, R. Grimm, C.B. Lebrilla, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 7471-7480.
- [49] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1988, 60, 2299-2301.
- [50] J.B. Fenn, M. Mann, C.-K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Science*, 1989, 246, 64-71.
- [51] P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.*, 1993, 65, 972A-986A.
- [52] G.C. Thorne, S.J. Gaskell, P.A. Payne, *Biomed. Mass Spectrom.* 1984, 11, 415-420.
- [53] C.A. Hughey, C.L. Hendrickson, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 6476-6481.
- [54] M. Wilm, M. Mann, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1-8.

- [55] M. Guilhaus, *J. Mass Spectrom.*, 1995, 30, 1519-1532.
- [56] G.J. O'Halloran, R.A. Fluegge, J.F. Betts, W.L. Everett, *The Bendix Corporation, Southfield, MI*, Report No. ASD-TDR-62-644, 1964.
- [57] P. Önnarfjord, J. Nilsson, L. Wallman, T. Laurell, G. Marko-Varga, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 4755-4760.
- [58] Edmond de Hoffmann, V. Stroobant, *Spectrométrie de masse*, DUNOD, Paris, 2005.
- [59] H. Steen, M. Mann, *Nature Reviews. Molecular cell biology*, 2004, 5, 699-711.
- [60] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.*, 1984, 11, 601-612.
- [61] K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 1988, 16, 99-111.
- [62] Z. Zhang, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 3908-3922.
- [63] M. Vollmer, C. Miller, B. Glatz, *Technical Overview, Agilent Technologies*, 5989-4148EN, November 2005.
- [64] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide*, Masson, Paris, 1982.
- [65] A. Premstaller, H. Oberacher, W. Walcher, A.M. Timperio, L. Zolla, J.-P. Chervet, N. Cavusoglu, A. van Dorsselaer, C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 2390-2396.
- [66] T.P. Weber, P.T. Jackson, P.W. Carr, *Anal. Chem.*, 1995, 67, 3042-3050.
- [67] H. Oberacher, A. Premstaller, C.G. Huber, *J. Chromatogr. A*, 2004, 1030, 201-208.
- [68] L. R. Snyder, *Anal. Chem.*, 1967, 39, 698-704.
- [69] C. Gatschelhofer, C. Magnes, T.R. pieber, M.R. Buchmeiser, F.M. Sinner, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1090, 81-89.
- [70] F. Eisenbeiß, S. Ehlerding, A. Wehrli, J.F.K. Huber, *Chromatographia*, 1985, 20, 657-663.
- [71] G. Félix, V. Descorps, *Chromatographia*, 1995, 40, 680-683.
- [72] E. van der Heeft, G. Jan ten Hove, C.A. Herberts, H.D. Meiring, C.A.C.M. van Els, Ad P. J. M. De Jong, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 3742-3751.
- [73] D.H. Kim, S.K. Lee, Y.H. Park, D.W. Lee, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 2002, 25, 433-443.
- [74] M. Zell, C. Husser, G. Hopfgartner, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1997, 11, 1107-1114.

- [75] G. Mitulović, M. Smoluch, J.-P. Chervet, I. Steinmacher, A. Kungl, K. Mechtler, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 376, 946-951.
- [76] J.A. Pascual, G.J. ten Hove, A.P.J.M. de Jong, *J. Microcolumn Separations*, 1996, 8, 383-387.
- [77] C.R. Mallet, J.R. Mazzeo, U. Neue, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2001, 15, 1075-1083.
- [78] M.K. Bayliss, D. Little, D.N. Mallett, R.S. Plumb, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2000, 14, 2039-2045.
- [79] J. Ding, U.D. Neue, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1999, 13, 2151-2159.
- [80] J. Ayrton, G.J. Dear, W.J. Leavens, D.N. Mallett, R.S. Plumb, *J. chromatogr. A*, 1998, 828, 199-207.
- [81] J.C. Giddings, *Dynamics of Chromatography. Part I. Principles and Theory*, M. Dekker, New York, 1965, p. 283.
- [82] L.R. Snyder, *Principles of Adsorption Chromatography*, M. Dekker, N.Y., 1968, p. 340.
- [83] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, J. Wiley & Sons Inc., USA, 1979.
- [84] J.W. Dolan, L.R. Snyder, T. Blanc, L. van Heukelem, *J. Chromatogr. A*, 2000, 897, 37-50.
- [85] W.S. Hancock, R.C. Chloupek, J.J. Kirkland, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A*, 1994, 686, 31-43.
- [86] R.C. Chloupek, W.S. Hancock, B.A. Marchylo, J.J. Kirkland, B.E. Boyes, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A*, 1994, 686, 45-59.
- [87] P.-L. Zhu, L.R. Snyder, J.W. Dolan, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, L.C. Sander, T.J. Waeghe, *J. Chromatogr. A*, 1996, 756, 21-40.
- [88] P.-L. Zhu, L.R. Snyder, J.W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 1996, 756, 41-50.
- [89] P.-L. Zhu, L.R. Snyder, J.W. Dolan, D.W. Hill, L. van Heukelem, T.J. Waeghe, *J. Chromatogr. A*, 1996, 756, 51-62.
- [90] P.-L. Zhu, L.R. Snyder, J.W. Dolan, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, J.-T. Lin, L.C. Sander, L. van Heukelem, *J. Chromatogr. A*, 1996, 756, 63-72.
- [91] J. Ryu, S. Park, T.Y. Chang, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1075, 145-150.

- [92] S. Teramachi, H. Matsumoto, T. Kawai, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1100, 40-44.
- [93] F. Lestreman, A. Cooper, R. Szucs, F. David, P. Sandra, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1109, 191-196.
- [94] R. Dolfinger, D.C. Locke, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 1355-1364.
- [95] C.T. Mant, Y. Chen, R.S. Hodges, *J. Chromatogr. A*, 2003, 1009, 29-43.
- [96] Y. Chen, C.T. Mant, R.S. Hodges, *J. Chromatogr. A*, 2004, 1043, 99-111.
- [97] D.R. Stoll, P.W. Carr, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 5034-5035.
- [98] X.Q. Yang, L.J. Ma, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1079, 213-220.
- [99] P. Szabelski, A. Cavazzini, K. Kacmarski, J. VanHorn, G. Guiochon, *Biotechnol. Progr.*, 2002, 29, 439-449.
- [100] L. R. Snyder, J. W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 2000, 892, 107-121.
- [101] K.B. Sentell, N.I. Ryan, A.N. Henderson, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 307, 203-215.
- [102] Y. Yang, *Anal. Chim. Acta*, 2006, 558, 7-10.
- [103] R.G. Wolcott, J.W. Dolan, L.R. Snyder, S.R. Bakalyar, M.A. Arnold, J.A. Nichols, *J. Chromatogr. A*, 2000, 869, 211-230.
- [104] M. Ghitun, E. Bonneil, L. Côté, G.L. Gauthier, P. Thibault, *Application Note, Agilent Technologies*, 5989-5222EN, June, 2006.
- [105] J.W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 2002, 965, 195-205.
- [106] L.R. Snyder, *J. Chromatogr. B*, 1997, 689, 105-115.
- [107] D. Bolliet, C. F. Poole, *Analyst*, 1998, 123, 295-299.
- [108] S. Ekstrom, P. Onnerfjord, J. Nilsson, M. Bengtsson, T. Laurell, G. Marko-Varga, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 286-293.
- [109] J.P. Kutter, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *J. Microcol. Sep.*, 2000, 12, 93-97.
- [110] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M. Frechet, *J. Anal. Chem.*, 2001, 73, 5088-5096.
- [111] J.E. MacNair, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 983-989.
- [112] J.E. MacNair, K.D. Patel, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 700-708.
- [113] M.V. Metodiev, A. Timanova, D.E. Stone, *Proteomics*, 2004, 4, 1433-1438.
- [114] K. Gevaert, A. Staes, J. van Damme, S. de Groot, K. Hugelier, H. Demol, L. Martens, M. Goethals, J. vandeKerckhove, *Proteomics*, 2005, 5(14), 3589-99.
- [115] J.E. Kim, S.R. Tannenbaum, F.M. White, *J. Proteome Res.*, 2005, 4, 1339-1346.
- [116] G. Rovera, T.G. O'Brien, L. Diamond, *Science*, 1979, 204, 868-870

- [117] N. Feuerstein, H.L. Cooper, *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 2788-2788.
- [118] R. Picone, E.L. Kajtaniak, L.S. Nielsen, N. Behrendt, M.R. Mastronicola, M.V. Cubelis, M.P. Stoppelli, S. Pedersen, K. Danø, F. Blasi, *J. Cell Biol.*, 1989, 108, 693-702.
- [119] M. Desjardins, J.E. Celis, G. van Meer, H. Dieplinger, A. Jahraus, G. Griffiths, L.A. Huber, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 32194-32200.
- [120] A. Schlosser, R. Volkmer-Engert, *J. Mass Spectrom.*, 2003, 38, 523-525.
- [121] R. Kearney, P. Thibault, *J. Bioinfo. Comput. Biol.*, 2003, 1, 183-200.
- [122] K. Lan, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 709-714.
- [123] D.-R. Wu, H.C. Greenblatt, *J. Chromatogr. A*, 1995, 702, 157-162.
- [124] B. Blagoev, S.E. Ong, I. Kratchmarova, M. Mann, *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22, 1139-1145.
- [125] J. Rush, A. Moritz, K.A. Lee, A. Guo, V.L. Goss, E.J. Spek, H. Zhang, X.M. Zha, R.D. Polakiewicz, M.J. Comb, *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23, 94-101.
- [126] L. Andersson, J. Porath, *Anal. Biochem.*, 1986, 154, 250-254.
- [127] M.C. Posewitz, P. Tempst, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 2883-2892.
- [128] S.B. Ficarro, M.L. McClelland, P.T. Stukenberg, D.J. Burke, M.M. Ross, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, F.M. White, *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20, 301-305.
- [129] Y. Oda, T. Nagasu, B.T. Chait, *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 379-382.
- [130] M. Adamczyk, J.C. Gebler, J. Wu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2001, 15, 1481-1488.
- [131] J. Ahrahm, G. Rovera, *Mol. Cell. Biochem.*, 1980, 31, 165-175.
- [132] S.A. Beausoleil, M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villen, J. Li, M.A. Cohn, L.C. Cantley, S.P. Gygi, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2004, 101, 12130-12135.
- [133] K. Bernard, E. Litman, J.L. Fitzpatrick, Y.G. Shellman, G. Argast, K. Polvinen, A.D. Everett, K. Fukasawa, D.A. Norris, N.G. Ahn, K.A. Resing, *Cancer Res.* 2003, 63, 6716-6725.
- [134] H. Shu, S. Chen, Q. Bi, M. Mumby, D.L. Brekken, *Mol. Cell. Proteomics*, 2004, 3, 279-286.
- [135] G.M. Whitesides, *Nature*, 2006, 442, 368-373.
- [136] I.M. Lazar, J. Grym, F. Foret, *Mass Spectrom. Reviews*, 2006, 25, 573-594.

- [137] J.T. Kapron, E. Pace, C.K. van Pelt, J. Henion, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, 17, 2019-2026.
- [138] C. Yu, M. Xu, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. A*, 2002, 40, 755-769.
- [139] S. Le Gac, J. Carlier, J.-C. Camart, C. Cren-Olivé, C.J. Rolando, *J. Chromatogr. B*, 2004, 808, 3-14.
- [140] Y. Yang, C. Li, J. Kameoka, K.H. Lee, H.G. Craighead, *Lab Chip*, 2005, 5, 869-876.
- [141] M. McEnery, A. Tan, J. Alderman, J. Patterson, S.C. O'Mathuna, J.D. Glennon, *Analyst*, 2000, 125, 25-27.
- [142] J.D. Xu, L. Locascio, M. Gaitan, C.S. Lee, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1930-1933.
- [143] M. Svedberg, M. Veszelei, J. Axelsson, M. Vangbo, F. Nikolajeff, *Lab Chip*, 2004, 4, 322-327.
- [144] M. Ghitun, E. Bonneil, M.-H. Fortier, H. Yin, K. Killeen, P. Thibault, *J. Sep. Sci.*, 2006, 29, 1539-1549.
- [145] M. R. Larsen, T. E. Thingholm, O. N. Jensen, P. Roepstorff, T. J. D. Jørgensen, *Mol. Cell. Proteomics*, 2005, 4, 873-886.
- [146] E. Bonneil, S. Tessier, A. Carrier, P. Thibault, *Electrophoresis*, 2005, 26, 4575-4582.
- [147] X. Zhuang, Y. Kuramitsu, M. Fujimoto, E. Hayashi, X. Yuan, K. Nakamura, *Electrophoresis*, 2006, 27, 1659-68.
- [148] S. R. Pereira, V. M. Faça, G. G. Gomes, R. Chammas, A. Maria Fontes, D. T. Covas, Lewis J. Greene, *Proteomics*, 2005, 5, 1186-1198.
- [149] D. Chatterjee, P. Pantazis, G. Li, T.A. Bremner, E.A. Hendrickson, J.H. Wyche, *Oncogene*, 2000, 19, 4108-4116.
- [150] P. Liang, T.H. MacRae, *J. Cell Sci.*, 1997, 110, 1431-1440.
- [151] J. Grantham, L.W. Ruddock, A. Roobol, M.J. Carden, *Cell Stress Chaperones*, 2002, 7, 235-242.
- [152] K. C. M. Verhoeckx, S. Bijlsma, E. M. de Groene, R. F. Witkamp, J. van der Greef, R. J. T. Rodenburg, *Proteomics*, 2004, 4, 1014-1028.
- [153] J. Grantham, K.I. Brackley, K.R. Willison, *Exp Cell Res*, 2006, 312, 2309-24.

- [154] P.Benes, V. Macečková, Z. Zdráhal, H.Konečná, E. Zahradníčková, Jan Mužík, J. Šmarda, *Differentiation*, 2006, 74, 265-276.
- [155] J. Galea-Lauri, D.S. Latchman, D.R. Katz, *Exp. Cell Res.*, 1996, 226, 243–254.
- [156] S.P. Lees-Miller, C.W. Anderson, *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 2431-2437.
- [157] K. Ah Park, H. Sun Byun, M. Won, K.-J. Yang, S. Shin, L. Piao, J. Man Kim, W.-H. Woon, E. Junn, J. Park, J. H Seok, G. M. Hur, *Carcinogenesis*, 2006, E-Pub, June 14.
- [158] S. Zolnierowicz, M. Bollen, *EMBO J.*, 2000, 19, 483–488.
- [159] J.C. Venter, et al. *Science*, 2001, 291, 1304–1351.
- [160] M. Mann, S.-E. Ong, M. Grønborg, H. Steen, O. N. Jensen, A. Pandey, *Trends in biotechnol.*, 2002, 20, 261-268.
- [161] K. M. Loyet, J. T. Stults, D. Arnott, *Mol. Cell. Proteomics*, 2005, 4, 235-245.
- [162] E. Salih, *Mass Spectrometry Reviews*, 2005, 24, 828– 846.
- [163] J. Reinders, A. Sickmann, *Proteomics*, 2005, 5, 4052–4061.
- [164] M.W. Pinkse, P.M. Uitto, M.J. Hilhorst, B. Ooms, A.J.R. Heck, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 3935-3943.
- [165] H. Kyong Kweon and K. Håkansson, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 1743-1749.
- [166] A. Tanabe, Y. Kamisuki, H. Hidaka, M. Suzuki, M. Negishi, Y. Takuwa, *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, 345, 156-161.
- [167] U. Marklund, G. Brattsand, V. Shingler, M. Gullberg, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 15039-15047.
- [168] P. Niethammer, P. Bastiaens, E. Karsenti, *Science*, 2004, 303, 1862-1866.
- [169] D.M. Willis, A.P. Loewy, N. Charlton-Kachigian, J.-S. Shao, D.M. Ornitz, D.A. Towler, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 37280-37291.
- [170] S.D. Brown, M.R. Thompson, N.C. Verberkmoes, K. Chourey, M. Shah, J. Zhou, R.L. Hettich, D.K. Thompson, *Mol. Cell. Proteomics*, 2006, 5, 1054-1071.
- [171] D. Cecconi, M. Donadelli, A. Scarpa, A. Milli, M. Palmieri, M. Hamdan, L.B. Areces, J. Rappsilber, P.G. Righetti, *J. Proteome Res.*, 2005, 4, 1909-1916.
- [172] B. Thiede, W. Höhenwarter, A. Krah, J. Mattow, M. Schmid, F. Schmidt, P.R. Jungblut, *Methods*, 2005, 35, 237-247.
- [173] M.E. McComb, D.H. Perlman, H. Huang, C.E. Costello, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, 21, 44-58.

- [174] A.L. Burlingame, X. Zhang, R.J. Chalkley, *Methods*, 2005, 36, 383-394.
- [175] K. Zhang, H. Tang, *J. Chromatogr. B*, 2003, 783, 173-179.
- [176] S.C. Galasinski, K.A. Resing, N.G. Ahn, *Methods*, 2003, 31, 3-11.
- [177] J.L. Stephenson, S.A. McLuckey, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 4026-4032.
- [178] N.L. Lelleher, H.Y. Lin, G.A. Valaskovic, D.J. Aaserud, E.K. Fridriksson, F.W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 806-812.
- [179] Y. Du, B.A. Parks, S. Sohn, K.E. Kwast, N.L. Kelleher, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 686-694.
- [180] Y. Wang, B.M. Balgley, P.A. Rudnick, C.S. Lee, *J. Chromatogr.*, 2005, 1073, 35-41.
- [181] B. Macek, L.F. Waanders, J.V. Olsen, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics Technol.*, 2006, 5, 949-958.
- [182] R.A. Zubarev, N.L. Kelleher, F.W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 3265-3266.
- [183] J. Waterborg, University of Missouri-Kansas City, USA, <http://sbs.umkc.edu/waterborg/chromat/ppt/DynAc02.ppt>, Accédé le 18 décembre 2006.
- [184] G. Fenselfeld, M. Groudine, *Nature*, 2003, 421, 448-453.
- [185] T.D. Pollard, W.C. Earnshaw, *Cell Biology*, Saunders, 2004, p 200.
- [186] T. Jenuwein, C.D. Allis, *Science*, 2001, 293, 1074-1080.
- [187] S.L. Berger, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2002, 12, 142-148.
- [188] C.B. Wilson, M. Merckenschlager, *Curr. Opin. Immunol.*, 2006, 18, 143-151.
- [189] D. Nelson, M.E. Perry, R. Chalkley, *Nucleic Acids Res.*, 1979, 6, 561-574.
- [190] I. Hirschler-Laszkiewicz, A. Cavanaugh, Q. Hu, J. Catania, M.L. Avantaggiati, L.I. Rothblum, *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 4114-4124.
- [191] *Brochure*, Agilent Technologies, 5989-2714EN, Usa, March, 2005.
- [192] D.M. Vigushin, S. Ali, P.E. Pace, N. Mirsaidi, K. Ito, I. Adcock, R.C. Coombes, *Clinical Cancer Research*, 2001, 7, 971-976.
- [193] P. Cheung, P. Lau, *Mol. Endocrinol.*, 2005, 19, 563-573.
- [194] D. Lee, C. Teyssier, B.D. Strahl, M.R. Stallcup, *Endocrine Revs.*, 2005, 26, 147-170.

- [195] B.Sarg, W. Hellinger, H. Talasz, E. Koutzamani, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 53458-53464.
- [196] J. Mingarro, R. Sendra, M.L. Salvador, L. Franco, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 13248-13252.
- [197] B.M. Turner, L.P. O'Neill, I.M. Allan, *FEBS Letters*, 1989, 253, 141-145.
- [198] K. Zhang, K.E. Williams, L. Huang, P. Yau, J.S. Siino, E.M. Bradbury, P.R. Jones, M.J. Minch, A.L. Burlingame, *Mol. Cell. Proteomics*, 2002, 1, 500-508.